



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : MICROBIOLOGIE

: الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

*Etude de l'effet de la température sur la production de la protéase
alcaline.*

Tests d'applications biotechnologiques sur l'enzyme.

Présenté et soutenu par : BOUREGHIDA Feriel

Le :27 /06/2016

BRACHENE Abir

Jury d'évaluation :

Présidente : **Mme. MERGOUD L.**

M.A.A. U.F.Mentouri Constantine

Rapporteur : **Melle. BELMESSIKH A.**

M.A.A. U.F.Mentouri Constantine

Examinatrice : **Melle. ABDELAZIZ O.**

M.A.A. U.F.Mentouri Constantine

Année universitaire 2015 - 2016

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à DIEU tout puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

« Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie (RDC), de Biochimie et de Biologie et Environnement au Biopôle de Chaab-Ersass. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Des Frères Mentouri Constantine ».

Nos remerciements s'adressent en premier lieu à Melle BELMESSIKH Aicha, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, pour sa patience, ses encouragements, sa rigueur et son Orientation dont j'ai pu bénéficier. Puisse ce travail vous exprime notre vive gratitude et notre grand estime.

Nous voudrions remercier sincèrement, Mme MERGOUD Lilia, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, qui nous fait l'honneur de présider notre soutenance.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Melle ABDELAZIZ Ouided, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillances et nous en sommes très honorés.

Également, nous tenons à remercier les techniciens et les employés du laboratoire de Microbiologie (RDC), pour l'aide offerte lors des différentes étapes de la réalisation de ce travail.

Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à tous nos proches pour le support moral, l'encouragement et la compréhension qu'ils nous ont offert tout au long de nos études.

Table des matières

	Page
Introduction.....	1
 Chapitre 01 : Synthèse bibliographique	
1. Les moisissures.....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Conditions de croissance	3
1.2.1. Carbone	4
1.2.2. Humidité.....	4
1.2.3. pH.....	4
1.2.4. Température.....	5
1.2.5. Oxygène.....	5
1.2.6. Lumière.....	5
2. Les protéases.....	6
2.1. Généralités.....	6
2.2. Propriétés.....	6
2.3. Classification	7
2.4. Origine des enzymes industrielles	9
2.4.1. Protéases des moisissures.....	9
2.4.2. Protéases des levures.....	9
2.4.3. Protéases des bactéries.....	10
2.5. Mode d'action.....	10
2.6. Applications des protéases.....	10
2.6.1. Industrie alimentaire	11
❖ Fromagerie	11
❖ Boulangerie.....	11
2.6.2. Utilisation médicale.....	11
2.6.3. Industrie des détergents.....	12
2.6.4. Traitement des eaux usées industrielles.....	12
2.6.5. Tannerie.....	13

2.6.6. Autres applications.....	13
2.7. Kératinases.....	13
2.7.1. Généralités.....	13
2.7.2. Sources microbiennes des kératinases.....	14
2.7.3. Applications des protéases kératinolytiques en biotechnologie.....	15
2.7.4. Traitement de cuir et caractéristique de l'effluent de tannerie.....	15
3. les Plumes.....	17
3.1. Déchets de volailles.....	17
3.2. Structure des plumes.....	18
3.3. Kératines de plumes	18
3.4. Valorisation des plumes de volaille.....	19

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	22
1.1. Repiquage des souches	23
1.2. Conservation	23
1.3. Préparation de l'inoculum	23
2. Méthodes de fermentation	23
2.1. Substrat de fermentation.....	23
2.2. Préparation des plumes.....	24
2.3. Préparation du milieu de culture.....	24
2.4. Conduite de la fermentation.....	24
3. Méthodes de dosage	25
3.1. Réaction enzymatique.....	25
3.2. Protocole de dosage.....	26
4. Détermination du poids sec des plumes dégradées.....	26
5. Méthodes des tests	26
5.1. Test du délainage.....	26
5.2. Digestion des protéines naturelles	27
5.3. Compatibilité avec des détergents commerciaux.....	27
5.4. Analyse de la performance du lavage.....	28

Chapitre 03 : Résultats et Discussion

1. Présentation des résultats de fermentations.....	29
1.1. Résultats du pH.....	29
1.2. Résultats de l'activité protéolytique.....	30
1.3. Effet de la température sur la production de la protéase alcaline.....	32
1.4. Mise en évidence du pourcentage du poids dégradé des plumes (%).....	36
2. Résultats des tests.....	37
2.1. Test du délainage.....	37
2.2. Digestion des protéines naturelles	40
2.3. Compatibilité avec les détergents commerciaux.....	43
2.4. Test de lavage.....	44
Conclusion	48
Références bibliographiques.....	50

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar.

TCA : TriChloroacetic Acid.

% : Pourcentage.

pH : potentiel d'Hydrogène.

°C : Degré Celsius.

h : heure.

min : minute.

g : gramme.

µg : microgramme.

rpm : rotation par minute.

U : Unité.

ml : millilitre.

L : litre.

nm : nanomètre

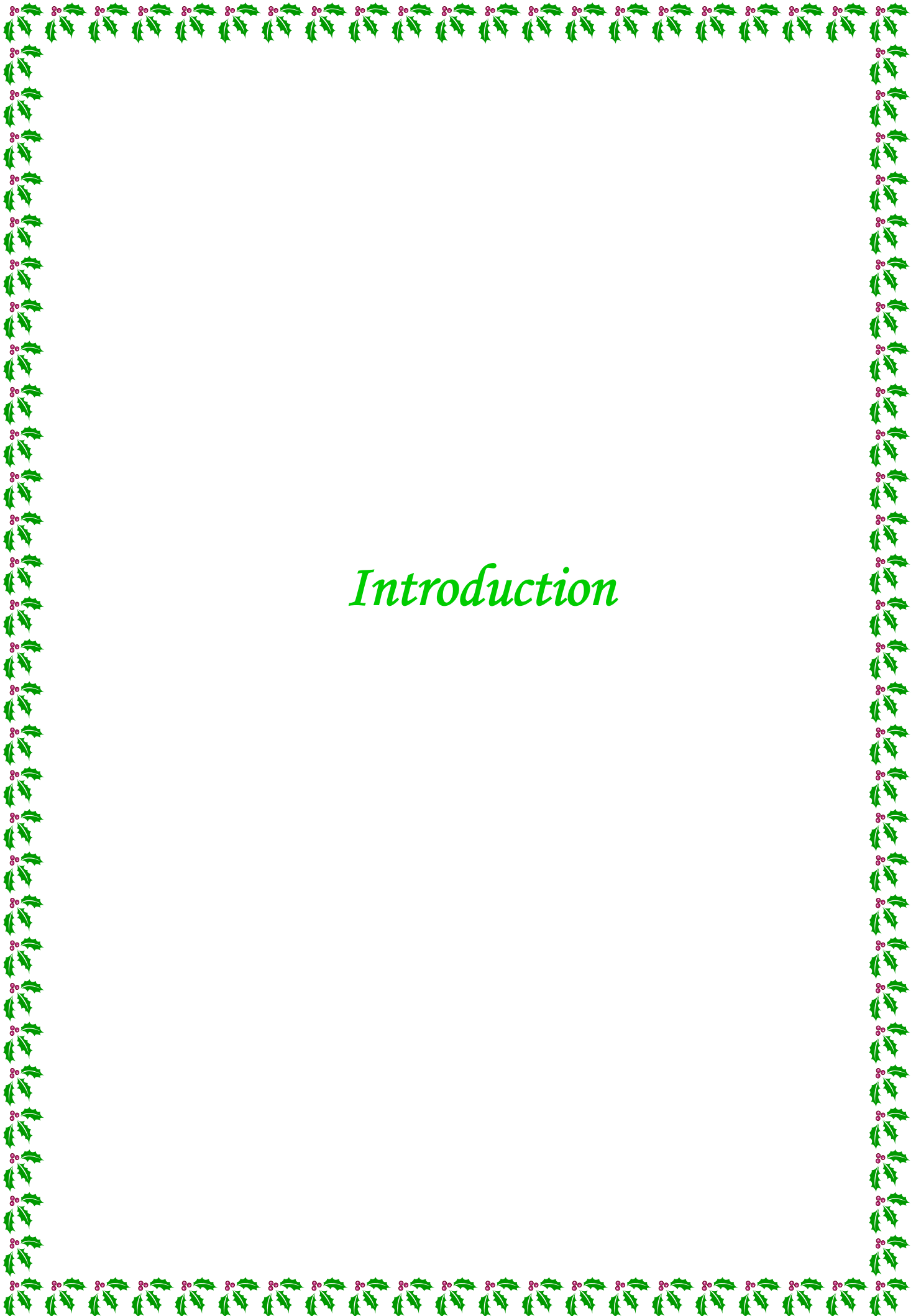
E.C. : Enzyme Commission

Liste des figures

	page
Figure 01 : Photo présentant les différentes étapes de tannage de cuir.....	17
Figure 02 : L'accumulation des déchets de plumes issus de l'industrie de la volaille.....	18
Figure 03 : Schéma de la structure d'une plume.....	19
Figure 04 : Photos des cultures des souches fongiques utilisées.....	21
Figure05 : Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml pour les quatre températures.....	24
Figure 06: Incubation des erlenmeyers pour le test de délainage.....	27
Figure 07: Les deux détergents commerciaux choisis.....	28
Figure08 : Résultats de l'activité protéasique pour les souches fermentées sous les quatre températures.....	31
Figure 09: Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les 11 souches.....	35
Figure 10: Résultats du délainage pour les extraits enzymatiques testés.....	39
Figure 11: Résultats de la digestion des protéines (cas du blanc d'œuf).....	41
Figure 12: Résultats de la digestion des protéines (cas du sang coagulé).....	43
Figure 13: Stabilité des extraits de la protéase alcaline des souches fongiques en présence des détergents commerciaux solides.....	44
Figure 14: Résultats des pièces lavées par l'extrait enzymatique seul.....	46
Figure 15: Résultats des pièces lavées par extrait enzymatique et solution du détergent "LE CHAT".....	47

Liste des Tableaux

	page
Tableau 01 : Principales classes d'enzymes.....	7
Tableau 02 : Classification des protéases.....	8
Tableau 03 : Composition chimique des plumes (PARRADO et <i>al.</i> ,2014)....	19
Tableau 04 : Procédés de valorisation matière et organique des plumes (NOUAD, 2011)	20
Tableau 05 : Résultats du pH pour les souches fermentées à différentes températures.....	29
Tableau 06 : Pourcentage du poids des plumes dégradées par chaque souche après fermentation sous les quatre températures.....	36



Introduction

Introduction

Au cours des deux dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention du matériel biologique très divers, modifié génétiquement ou non et susceptible d'être utilisé dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes.

Les protéases sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus vitales, qui sont principalement synthétisées par un groupe diversifié de microorganismes (À savoir, des bactéries, des levures et des moisissures) et se trouvent également dans les tissus végétaux et animaux. Les protéases représentent 60% des ventes totales des enzymes dans le marché mondial, qui sont utilisées dans plusieurs industries : alimentaire, tannerie, laitière, pharmaceutique et gestion de déchets (RAO et *al.*, 1998 ; RAI et *al.*, 2010). Les protéases alcalines sont particulièrement appropriées pour les applications industrielles en raison de leur grande stabilité et activité sous des conditions difficiles telles que température élevée, pH alcalin et en présence d'agents tensio-actifs ou des agents oxydants (ABIDI et *al.*, 2008).

L'inconvénient principal des protéases d'origine bactérienne est l'exigence de procédures à coût intensif pour la séparation d'enzymes à partir des cellules, de l'autre côté, les enzymes d'origine fongique offrent un avantage de séparation du mycélium par simple filtration. Par ailleurs, le champignon peut être cultivé sur substrats peu coûteux (KALPANA DEVI et *al.*, 2008).

La production et la consommation de la volaille dans le monde ont connus un développement important au cours des 30 dernières années. En effet, la chair de volaille est la deuxième viande la plus consommée au monde, avec une production en croissance permanente, qui a atteint 91,6 et 101 millions de tonnes en 2009 et 2011, respectivement.

Parmi les pays de la région du *Grand Maghreb*, l'*Algérie* figure dans les premières places dans l'élevage des poulets. Elle représente ces dernières années, 34,71 % du cheptel de volaille de la région selon les espèces, avec un nombre de tête de poulets atteignant 140 millions (DIARRA, 2014). Avec cette grande production, des milliers de tonnes de sous-produits organiques sous forme de viscères, des pieds, des têtes, des os, du sang et des plumes sont générés (ZHU et *al.*, 2010).

Les plumes constituent jusqu'à 5-10 % du poids total de poulet. Etant donné que ces plumes sont composées principalement de la kératine ; une protéine structurale insoluble (OSCAR et *al.*, 2015), elles ne sont donc pas dégradables par les enzymes protéolytiques communes telles que la trypsine, la pepsine, la papaïne. Par conséquent, les plumes peuvent constituer un problème environnemental. (ABIDI et *al.*, 2008). Pour remédier à ce problème, ces résidus kératiniques peuvent être efficacement gérés et convertis en produits utiles par l'action d'une classe spéciale de protéases : les kératinases produites par des microorganismes isolés le plus souvent du sol et de déchets de volaille (PILLAI et *al.*, 2011). En fait, cette bioconversion permet de générer des farines de plumes riches en acides aminés, des engrais à usage agricole, des protéines digestibles utilisées comme additifs alimentaires pour animaux (ADRIANO et *al.*, 2015).

En outre, dans l'industrie du cuir, les conditions alcalines facilitent le renflement des poils et l'attaque subséquente de protéase permettant une épilation facile. Par conséquent, des efforts ont été faits pour développer de nouvelles protéases alcalines pour le délainage. Bien que l'activité kératinolytique a été déjà rapportée chez plusieurs espèces bactériennes et fongiques (JAOUADI et *al.*, 2009). Cependant, il y a toujours une importance d'obtenir de nouvelles protéases avec une forte activité de délainage.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la recherche de protéases en l'occurrence de kératinases thermostables produites par des souches fongiques isolées du sol de source thermale. Pour cela, plusieurs objectifs ont été fixés dans ce travail, à savoir :

- ✓ Réactivation des souches fongiques conservées ;
- ✓ Préparation des inocula pour la fermentation ;
- ✓ Production de la protéase alcaline par ces souches, sur milieu à base de plumes de poulet à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C et 45°C) ;
- ✓ Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts obtenus ;
- ✓ Réalisation des tests d'application sur ces derniers.



Chapitre 01
Synthèse Bibliographique

1. Les moisissures

1.1. Généralités

Les moisissures sont largement répandues dans la nature et sont communément observées sur le pain rassis, le fromage ou les fruits. Elles constituent avec les levures les deux groupes de champignons microscopiques ou mycètes. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. Elles possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé *thalle* (BOTTON et *al.* 1990).

Les cellules de moisissures forment des filaments (hyphes) où chacun montre une croissance apicale. La ramification des hyphes au cours de leur croissance sur un substrat donne le mycélium ; un mycélium et ses spores forment le thalle, détectable à l'œil nu (GUIRAUD, 1998 ; PERRY et *al.* 2004 ; WALKER et WHITE, 2005). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse ; la chitine est un polymère formé d'unité de N'acétyle glucosamine (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Durant la croissance, la division des noyaux peut être accompagnée par la formation de *septa* délimitant une cellule. Toutefois, la formation des *septa* est d'ordinaire incomplète laissant un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Parfois celle-ci n'existe pas ; l'hyphe correspond alors à un tuyau contenant du cytoplasme où baignent les noyaux, le thalle est donc d'organisation *coenocytique* (SCRIBAN, 1993 ; PERRY et *al.* 2004 ; MADIGAN et MARTINKO, 2007).

1.2. Conditions de croissance

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées

(extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (DAVET, 1996).

1.2.1. Carbone

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans la cellule fongique. Il représente environ 50 % de la cellule, tandis que la teneur en azote varie entre 10 et 15% (RIVIERE, 1975 ; SCRIBAN, 1993). Ainsi, le rapport carbone/azote influe considérablement la croissance et il est pour les mycètes de l'ordre de 20/1 ; un rapport proche de 20 permet une bonne croissance mycélienne (BARKER et WORGAN, 1981 ; BOTTON et *al.* 1990). Grâce à la glycolyse et au métabolisme aérobie, les mycètes assimilent les sucres facilement métabolisables comme le glucose, le maltose, le saccharose et les polymères tels que l'amidon (NICKLIN *etal.* 1999).

1.2.2. Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (DAVET, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (BOURGEOIS, 1989).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de - 4 MPa (méga pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à - 10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (DAVET, 1996).

1.2.3. pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (BOTTON et *al.* 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae* (URBANEK et *al.* 1984 ; DELGADO-JARANA *etal.* 2002).

1.2.4. Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (BOURGEOIS, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (BOTTON et al. 1999 ; JULIEN, 2002). Quelques espèces sont thermo tolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (BOTTON et al. 1999 ; NICKLIN et al. 2000). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (DAVET, 1996 ; BOTTON et al. 1999).

1.2.5. Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (BOURGEOIS, 1989 ; BOTTON et al. 1999).

1.2.6. Lumière

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (BOTTON et al. 1999).

2. Les protéases

2.1. Généralités

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont normalement générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (MUKHERJEE *et al.* 2008 ; BENEDYKT et KATARZYANA, 2008 ; REDDY *et al.* 2008 ; WILKESMAN et KURZ, 2009). Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicale et dans les domaines de recherche (CORAL *et al.* 2003 ; SANDHYA *et al.* 2005).

2.2. Propriétés

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que : le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (SUMANTHA *et al.*, 2006 ; VISHWANATHA *et al.* 2009). La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (SUMANTHA *et al.* 2006 ; BENEDYKT et KATARZYANA, 2008).

Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides. Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnels, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (BENEDYKT et KATARZYANA, 2008).

2.3. Classification

D'après "The Enzyme Commission of Classification", les protéases appartiennent au groupe 3 (les hydrolases) et sous-groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques) (RAO et al., 1998; SUMANTHA et al., 2006; WILKESMAN et KURZ, 2009). Auparavant, la classification a été basée essentiellement sur la source d'enzyme, l'action de catalyse, le poids moléculaire et la spécificité de substrat ou de la charge. Cependant, un système plus rationnel s'utilise actuellement basé sur la comparaison des sites actifs, les mécanismes d'action et sur la structure tridimensionnelle (AGUILAR et al. 2008).

Tableau 01 : Principales classes d'enzymes (qui hydrolysent les liaisons peptidiques) (RAO et al. 1998 ; SUMANTHA et al. 2006 ; WILKESMAN et KURZ, 2009).

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Catalysent les réactions d'oxydoréduction des alcools, cétones, aldéhyde....
Transférases	Transfèrent les groupes : mono carboné, azoté, phosphorés ...
Hydrolases	Lysent des liaisons esters, amides, Thio ester en présence d'eau.
Lyases	Permettent la formation des doubles liaisons ou l'addition des groupements fonctionnels sur ces liaisons (C=C, C=O, C=N).
Isomérases	Isomérases permettent l'isomérisation-racisation.
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP.

Les protéases peuvent être réparties en deux grands groupes en fonction de leur capacité de couper les liaisons peptidiques N- ou C-terminales (exopeptidases : amino-peptidases, carboxy-peptidases respectivement), ou les liaisons peptidiques internes (endopeptidases, appelées également les protéinases) (Tableau 01) (SUMANTHA *et al.*, 2006 ; BENEDYKT et KATARZYNA, 2008 ; BELITZ *et al.*, 2009). Les enzymes protéolytiques sont généralement classifiées suivant :

- Le pH optimum, en protéases acides, alcalines et neutres ;
- Le substrat spécifique, en collagénases, en kératinases, en élastases,...
- L'homologie avec d'autres protéases antérieurement étudiées comme la trypsine, la pepsine,... en trypsin-like, en pepsin-like, ...

Selon "*The International Union of Biochemistry*", les protéinases sont divisées en quatre groupes en fonction du groupement fonctionnel au niveau du site actif et la sensibilité au différents inhibiteurs, dont certaines de ses propriétés sont représentées dans (Tableau02)(SUMANTHA*et al.*2006 ;AGUILAR*et al.* 2008).

Tableau 02 : Classification des protéases
(SUMANTHA*et al.*, 2006; AGUILAR*et al.*, 2008).

Types de protéases	Classes et sous-classes
Exopeptidases	<ul style="list-style-type: none"> • Amino-peptidases <ul style="list-style-type: none"> -Peptidyle peptidases -Dipeptidyle peptidases -Tripeptidyle peptidases • Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> -Sérine carboxypeptidases -Métallo-carboxypeptidases -Cystéine Carboxypeptidases
Endopeptidases	<ul style="list-style-type: none"> -Protéases à sérine -Protéases cystéine ou protéases thiols -Protéases aspartique ou protéases acides -Protéases thréonique -Protéases glutamique -Métallo protéases

2.4. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production (enzymes d'origine microbienne) par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (SCRIBAN, 1993). Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

2.4.1. Protéases des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40 % du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (FRAZIER, 1967 ; UL-HAQ et al. 2003).

2.4.2. Protéases des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (KRESZE, 1991 ; BOIRON, 1996).

2.4.3 Protéases des bactéries

Il s'agit essentiellement de la *subtilisine* ou *subtilase*, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (FRAZIER, 1967 ; CALK et al. 2000). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage du fromage. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (COUSIN et al. 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (DESMAZEAUD, 1978).

2.5. Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes :

- Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) par un proton cédé d'un résidu enzymatique.
- Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH- d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l'H₂O) (PELMONT, 1995).

2.6. Applications des protéases

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels (WANG et al., 2005 ; CHELLAPPAN et al., 2006 ; BARNALI et al., 2008 ; MUKHERJEE et al., 2008).

2.6.1. Industrie alimentaire

❖ Fromagerie

Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases microbiennes acides possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère (NEELAKANTAN et al. 1999 ;SUMANTHA et al., 2006) ; ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère, dont le développement a été limité par la pénurie de la présure animale. Le traitement chimique, par des agents oxydants, appliqué à l'extrait enzymatique obtenue à partir de *Mucormeihei* permet d'obtenir une enzyme aux propriétés similaires à celles de la présure de veaux, en termes de productivité et la qualité du produit final (AGUILAR et al. 2008).

❖ Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillusoryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (RAO et al., 1998).

2.6.2. Utilisation médicale

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale :

- Les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestifs gastro-intestinaux tels que la dyspepsie...
- La *brinase*, une protéase acide plasmine-like, hydrolyse la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artériocoagulés.

- La collagénase, qui hydrolyse le collagène natif, a été utilisée pour le débridement des ulcères cutanés et les brûlures, trouve également une application dans le traitement des cellules pathologiques des disques intervertébraux.
- La protéase alcaline de *Bacillus sp.* CK 11-4 a une activité fibrinolytique appliquée comme un agent thrombolytique.
- La protéase neutre "*dispase*" (amino-peptidase) est une enzyme produite par *Bacillus polymyxa*, exerce une activité protéolytique douce, ce qui la fait très utile pour l'isolement de cellules primaires et secondaires (sub-culture), car elle maintient l'intégrité des membranes cellulaires (GUPTA *etal.*,2002 ; SUMANTHA *et al.*, 2006).

2.6.3. Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (GUPTA *etal.*,2002). Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes.

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés.

2.6.4. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (KUMAR *etal.*,1999). DALEV (1994) a utilisé des protéases alcalines provenant de *B. subtilis* pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (ICHIDA*etal.*, 2001).

Enfin, une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amylolique fasciens* et *Streptomyces sp.* Est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques (GUPTA, 2002).

2.6.5. Tannerie

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées (MEUNIER, 1999). Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir des protéases d'*A. oryzae*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques (RAOetal., 1998 ; MEUNIER, 1999).

2.6.6. Autres applications

Certaines protéases sont utilisées aussi pour :

- Synthèse de peptides ;
- Traitement des rejets industriels ;
- Traitement de la soie ;
- Panification : Amélioration de l'élasticité de la pâte (les protéases fongiques) ;
- Industries laitière et fromagerie : Coagulation des protéines du lait et son aromatisation ;
- Brasserie : Prévention du trouble au froid de la bière par action de la papaïne ;
- Préparation des hydrolysats de protéines à usage microbiologique telles que la peptone et tryptone.

2.7. Kératinases

2.7.1. Généralités

Les kératinases, nommées aussi enzymes kératinolytiques représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines efficacement que d'autres protéases. Elles ont été classées comme des protéinases de

mécanisme inconnu tel que recommandé par l'IUBMB "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (1978) avec le numéro [EC 3.4.21/24/99.11] (GEORGE et al., 1995). Des recherches récentes ont indiqué que les kératinases sont comme les protéases à sérine en raison de leurs 97% d'homologie avec les protéases alcalines, et leur inhibition se fait par les mêmes inhibiteurs des protéases à sérine, et elles peuvent être aussi des métallo-protéases (IGNATOVA et al., 1999). Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et d'autres non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité.

2.7.2. Sources microbiennes des kératinases

Les kératinases sont très répandues dans le monde microbien et elles peuvent être identifiées à partir des eucaryotes, bactéries et archaebactéries. Ces microorganismes ont été isolés à partir de divers environnements à savoir : les sols de l'Antarctique, les sources chaudes et les environnements aérobies et anaérobies. Par conséquent, les kératinases microbiennes présentent une grande diversité de leurs propriétés biochimiques et biophysiques (SAHA, 2009).

Chez les bactéries, la dégradation de la kératine est surtout confinée aux bactéries à Gram positif des genres *Bacillus*, *Lysobacter*, *Kocuricaet* et *Microbacterium*. Néanmoins, les bactéries du genre *Bacillus spp.* sont classées dans la littérature parmi les genres bactériens les plus importants en termes de production de kératinases. En effet, diverses souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus cereus* ont été décrites comme kératinolytiques (GUPTA et RAMNANI, 2006).

Par ailleurs, un certain nombre de souches de bactéries à Gram négatif, à savoir : *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* et *Chryseobacterium*, ont également été signalées récemment comme des souches kératinolytiques. En plus, quelques espèces thermophiles et extrémophiles appartenant aux genres *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus* et *Nesternokia* ont également été décrites comme des producteurs de kératinase (GUPTA et RAMNANI, 2006).

En outre, les actinomycètes du groupe *Streptomyces*, à savoir *S. fradiae*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. thermoviolaceus* SD8 et *S. graminofaciens*, et le groupe de Thermoactinomyces, à savoir *T. candidus*, sont communément décrits comme dégradeurs de

la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plume (GUPTA et RAMNANI, 2006).

Les champignons kératinophiles constituent un groupe nutritionnel spécialisé qui utilise la kératine comme substrat nutritif riche (KORNILLOWICZ-KOWALSKA, 1997). Ces champignons sont représentés par des dermatophytes et des espèces apparentées au genre *Chrysosporium*. Les dermatophytes, à côté d'espèces pathogènes pour l'homme et animaux, comprennent des saprotrophes préférant la vie dans le sol (dermatophytes géophiles). Les dermatophytes géophiles incluent certaines espèces de *Trichophyton* et *Microsporum*.

Les champignons kératinophiles mais non dermatophytiques sont composés de deux genres : *Chrysosporium* et *Myceliophthora* (anamorphes). Certains auteurs (MALVIJA et al. 1992 ; SANTOS et al. 1996 ; FILIPELLO MARCHISIO et al. 2000 ; GUPTA et RAMNANI, 2006) classent également différentes espèces de moisissures omniprésentes comme des champignons kératinophiles, par exemple : *Aspergillus fumigatus* et *Scopulariopsis brevicaulis*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* Et autres.

Selon KUNERT (2000), les champignons sont faiblement kératinolytiques s'ils ne dégradent pas plus de 40 % de la kératine dans des cultures liquides après 8 semaines et sont non kératinolytiques s'ils dégradent moins de 20 %.

2.7.3. Applications des protéases kératinolytiques en biotechnologie

Les kératinases des microorganismes ont attiré beaucoup d'attention pendant la dernière décennie, en raison de la multitude de leurs applications industrielles. Actuellement, l'application la plus prometteuse des kératinases ou de microorganismes kératinolytiques est la production d'aliment nutritif et rentable pour les animaux familiaux. Les kératinases peuvent être aussi utilisées dans le traitement de cuir, des films photographiques, des rejets industriels, de la soie et de la protéine prion anormale.

2.7.4. Traitement de cuir et caractéristique de l'effluent de tannerie

Tanner le cuir sans produire d'effluents toxiques a toujours été le problème de cette industrie réputée polluante. Les produits chimiques traditionnellement utilisés pour le tannage sont des dérivés de plantes, tandis que le procédé le plus utilisé de nos jours est le tannage au chrome (Figure 01).

L'utilisation du traitement enzymatique pour le tannage de cuir diminue les coûts et améliore la qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présentant une teinte plus uniforme. Ce procédé biotechnologique, appliqué dans 30 à 50% de la fabrication mondiale, est employé à grande échelle en Australie, en France et au Royaume-Uni. Cette approche présente de nombreux autres avantages, notamment le contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes (ANDERSEN, 1998).

Les protéases alcalines qui possèdent des activités élastolytiques et kératinolytiques sont très demandées dans ce type d'industrie (GEORGE et al. 1995). Lors de l'étape de chaulage, le dégraissage enzymatique, par les kératinases, est le meilleur procédé recherché puisqu'il permet d'améliorer les propriétés physiques de la peau par l'hydrolyse sélective des constituants non collagèneux de la peau et la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline. De plus, il permet la dégradation des protéines interfibrillaires au niveau des peaux séchées, ce qui facilite l'adsorption de l'eau et raccourcit l'opération de trempage (GUPTA et al. 2002).

Actuellement, les kératinases utilisées à l'échelle industrielle sont, à titre d'exemples, *KorponEG*, *Actase P7*, *Actase P10*, *Actase P7*, *Enzymar SE12*, *RinodRN*, *Pyrasee* et *Confit Pancréatique* (JAOUADI, 2009).



Figure 01: Photo présentant les différentes étapes de tannage de cuir.

3. Plumes

3.1. Déchets de volailles

L'industrie mondiale de la volaille est énorme et elle est considérée parmi les plus polluantes en raison des grandes quantités de déchets générés. En effet, la viande destinée à l'alimentation humaine ne représente que 68 à 72 % et 78 % de chaque poulet et de chaque dinde, respectivement, alors que le reste devient des déchets après sa transformation

(HAINES,2004).Les principaux sous-produits générés dans les usines de transformation de la volaille sont des plumes, de la viande douce, du sang, des résidus de désossage, des pieds et viscères. Ces matériaux sont actuellement transformés en farine de viande et d'os, farine de plumes, farine du sang (SALMINEN et RINTALA, 2002 ; LASEKAN, 2013). Bien que celles-ci constituent une bonne source de protéines, leur utilisation peut être limitée en raison des restrictions alimentaires associées à des pertes en acides d'aminés essentiels (ONIFADE, et al. 1998).

Il est à noter qu'environ 4 millions de tonnes de plumes de volaille sont produits par an dans le monde entier (Figure 02) (SAHA, 2009). Ces déchets constituent cependant, une source potentielle de biomasse valorisable en raison de leurs teneurs en matière organique et en fibres.



Figure 02 :L'accumulation des déchets de plumes issus de l'industrie de la volaille (SAHA, 2009).

3.2. Structure des plumes

La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Le rachis porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces barbules sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets (FAKHFAKH, 2010). Les barbules se tiennent ensemble comme une fermeture éclair grâce à ces crochets(Figure 03).

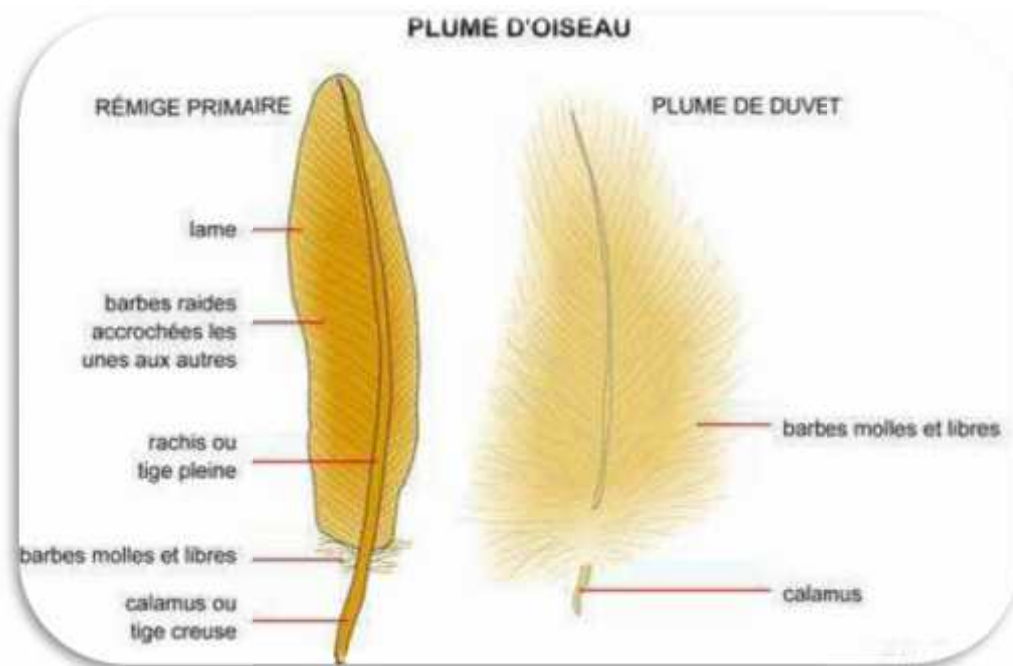


Figure 03 : Schéma de la structure d'une plume (FAKHFAKH, 2010).

3.3. Kératines de plumes

La kératine de plume est une protéine particulière. Elle a une teneur élevée de cystéine, un acide aminé soufré, qui est à l'origine de la formation de ponts disulfures, créant un réseau tridimensionnel compact engendrant une grande stabilité. La formation des ponts disulfures est assurée par oxydation des groupements thiols de deux cystéines appartenant à deux chaînes de kératine (KANNAPPAN, 2012). La présence de ces liaisons en grand nombre confère une grande insolubilité dans les solvants classiques et une résistance aux attaques chimiques. De ce fait, la kératine est une protéine particulière, résistante et stable (JACQUES, 2003).

Toute une plume est presque une matière protéique pure avec une teneur en protéines brutes de plus de 91 % (Tableau 03). La protéine des plumes connue comme kératine est riche en glycine, en sérine et en proline mais déficiente en certains acides aminés essentiels comme l'histidine, la méthionine et la lysine (SANGALI et BRANDELLI, 2000 ; OULED HADDAR et *al.* 2009). Cependant, la kératine est très résistante à la protéolyse par conséquent, elle est généralement soumise à un traitement thermo-chimique pour produire de la farine de plumes ayant une qualité protéique inférieure (LASEKAN et *al.* 2013).

Tableau 03 : Composition chimique des plumes (PARRADO et al., 2014).

Composition	Teneur (%)
Carbone	46,33 ± 0,14
Azote	14,14 ± 0,03
Soufre	1,91 ± 0,02
Relation C / N	3,28
Protéines	91,90 ± 0,20
Glucides	6,50 ± 0,35
Lipides	2,00 ± 0,15

3.4. Valorisation des plumes de volaille

A l'instar de la laine et du cuir, les plumes et les duvets sont des co-produits de l'industrie alimentaire. Ces deux matières naturelles ont des caractéristiques physiques spécifiques. En effet, leur pouvoir isolant et leur légèreté leur donne la propriété d'être utilisées dans de nombreuses applications courantes (NOUAD, 2011).

Les procédés identifiés comme voie potentielle de valorisation matière ou de valorisation organique des plumes sont résumés dans le tableau04.

Tableau 04 : Procédés de valorisation matière et organique des plumes (NOUAD, 2011).

Valorisation matière	Valorisation organique
<ul style="list-style-type: none"> -Extraction kératinique pour la fabrication de peinture résistante à la lumière (projet européen Polymérisation des fibres de plumes). - Filage de la matière kératinique (applications textiles). - Fabrication de textile non tissé avec nappage de plumes. 	<ul style="list-style-type: none"> -Fabrication d'amendement organique (compost) à partir de plumes sèches (déchets de l'industrie d'abattage) ou humides (déchets d'abattage d'oiseaux terrestres) ou de farines de plumes hydrolysées.

Les plumes et les duvets ne doivent donc pas, sauf cas particuliers, être considérés comme des déchets au sens habituel du terme, mais plutôt comme une matière première naturelle traditionnelle, au même titre que le cuir, la laine, les peaux de lapin, etc. (NOUAD, 2011).



Chapitre 02
Matériel et Méthodes

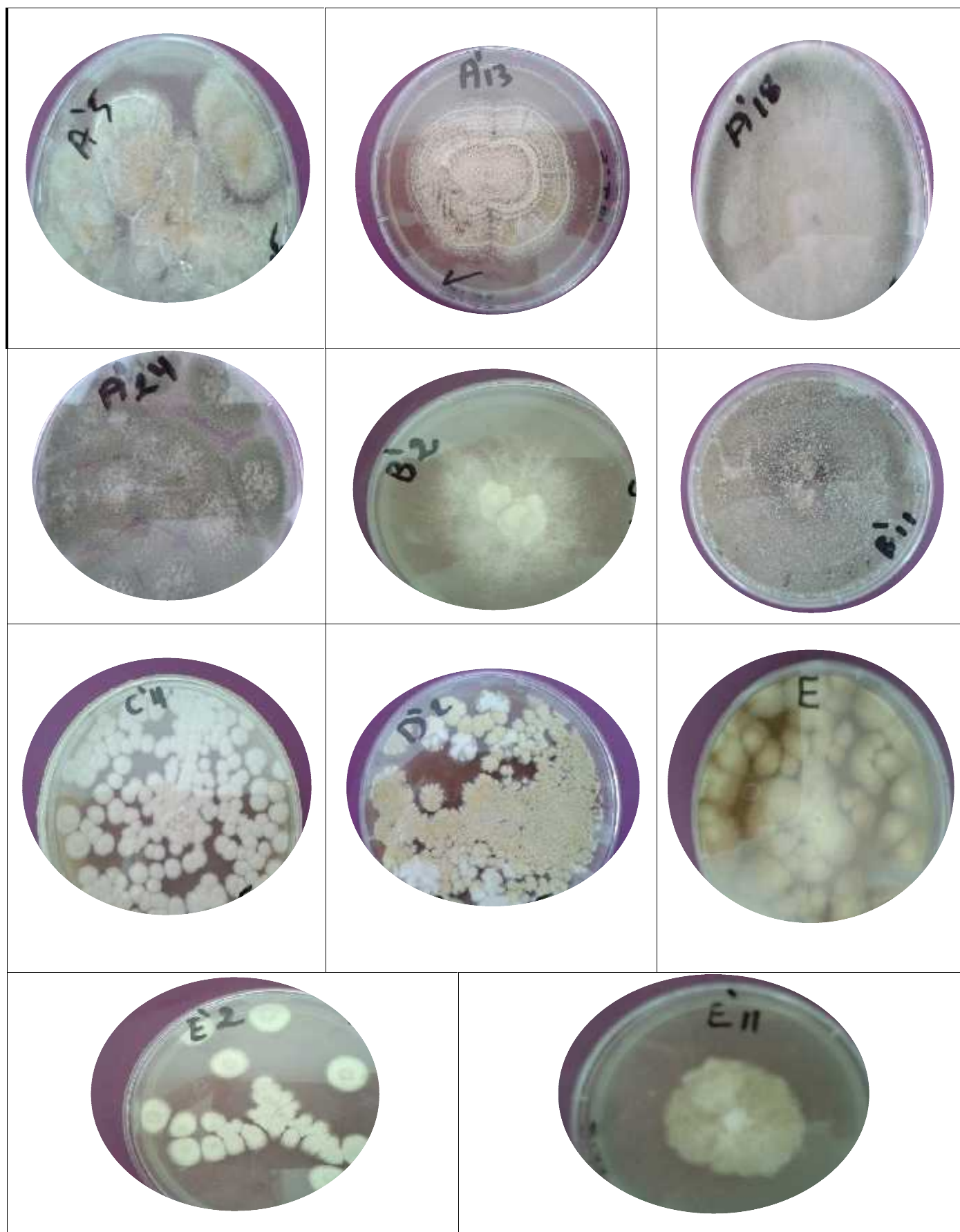


Figure 04 : Photos des cultures des souches fongiques utilisées.

Présentation du travail

Notre partie expérimentale a été réalisée entre Février et Juin 2016 au sein des locaux suivants :

- Laboratoire de Microbiologie RDC ;
- Laboratoire de Biochimie ;
- Laboratoire de Biologie et Environnement au Biopôle de *Chaab-Ersass*.

Tous ces locaux sont situés au niveau de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine.

Le travail a été réparti sur 5 parties successives, à savoir :

- ✓ 1^{ère} étape : Réactivation des souches fongiques conservées ;
- ✓ 2^{ème} étape : Préparation des inocula pour la fermentation ;
- ✓ 3^{ème} étape : Production de la protéase alcaline par ces souches, sur milieu à base de plumes de poulet à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C et 45°C) ;
- ✓ 4^{ème} étape : Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts obtenus (résultats) ;
- ✓ 5^{ème} étape : Réalisation de tests d'application sur ces derniers.

1. Matériel biologique

Les 11 souches de moisissures utilisées dans ce travail qui ont été isolées à partir de deux sites différents du sol de «*Hammam Debagh*», *Guelma, Algérie* par AMOURA et BAZ (2014), et identifiées par MECHEHALEH et YEKHLEF (2015), sont :

- A'5 : *Aureobasidium* sp.;
- A'13: *Aspergillus* sp.2 ;
- A'18: *Trichoderma* sp. ;
- A'24: *Aspergillus* sp.1 ;
- B'2: *Chrysosporium* sp.;
- B'11 : *Penicillium* sp. ;
- C'4 : *Aspergillus* sp.3 ;
- D'2 : *Aspergillus* sp.4 ;
- E : *Aspergillus* sp.6 ;
- E'2 : *Aspergillus* sp.5 ;
- E'11 : *Scedosporium* sp.

1.1. Repiquage des souches

Il a été réalisé par prélèvement de quelques spores ou un fragment mycélien à partir des cultures pures de chaque souche en tubes inclinés ou en boîtes de Pétri contenant du PDA (*Potato Dextrose Agar*) (voir Annexe 01), que l'on transfère sur le même milieu coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. La culture fongique a été incubée à 30°C pendant 5-7 jours. L'opération du repiquage a été répétée chaque mois.

1.2. Conservation

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée (BOTTON et *al.*, 1990), en utilisant comme milieu de conservation le PDA (PARKS, 1997). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (BOTTON et *al.*, 1990).

1.3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique utilisée. Cette dernière est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile à la souche cultivée sept jours sur milieu PDA en boîte de Pétri. À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension les spores fongiques. Ensuite, cette suspension a été récupérée superficiellement en utilisant une micropipette sous des conditions stériles.

Avant chaque inoculation, le nombre de spores dans la suspension de chaque souche a été estimé par référence aux courbes d'étalonnage réalisées par MECHEHALEH et YEKHLEF (2015). Le taux d'inoculum a été fixé à $\sim 2 \times 10^7$ spore/ml par réalisation des dilutions sur ces suspensions.

2. Méthodes de fermentation

La fermentation a été réalisée dans un milieu liquide à base de plumes de poulets dans le but de doser l'activité protéolytique développée par les souches fongiques testées.

2.1. Substrat de fermentation

Ce travail porte sur la recherche de moisissures kératinolytiques. Pour cela, des plumes de poulet ont été choisies comme substrat de fermentation. Ces plumes ont été fournies par la ferme de poulets dans la commune de *Lemridj, Constantine*.

2.2. Préparation des plumes

Le processus de préparation de plumes a été passé par les étapes suivantes :

- Nettoyage des déchets par élimination des saletés;
- Lavage successifs à l'eau de robinet ;
- Dernière étape de lavage se fait à l'eau distillée ;
- Séchage dans un four à 150°C pendant 5 min.

2.3. Préparation du milieu de culture

Les cultures submergées de chaque souche ont été réalisées sur milieu à base de plumes de poulet. Pour cela, 1g de ces dernières a été introduit dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de l'eau distillée pH 7. Cette opération a été effectuée à raison de 2 erlens par souche pour les quatre températures d'incubation (30°C, 35°C, 40°C et 45°C). L'ensemble de tous les erlens a été bouché par du coton cardé, couvert par du papier aluminium, puis stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20min.

2.4. Conduite de la fermentation

Après refroidissement, chaque 2 erlenmeyers a été inoculé par 1 ml d'une suspension sporale ($\sim 2 \times 10^7$ spore/ml) de la même souche fongique. Ensuite, ces erlenmeyers ont été incubés dans un incubateur agitateur à 150 rpm (type : *Edison*) pendant sept jours aux températures suivantes : 30°C, 35°C, 40°C et 45°C.

Après les 7 jours de fermentation, les milieux de culture ont été filtrés à travers le papier Whatman n°1 préalablement séché et pesé. Le filtrat clair ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut. Il a été congelé pour les dosages ultérieurs.

A la fin des fermentations, les paramètres pH, activité protéolytique et poids sec des plumes restantes ont été estimés.

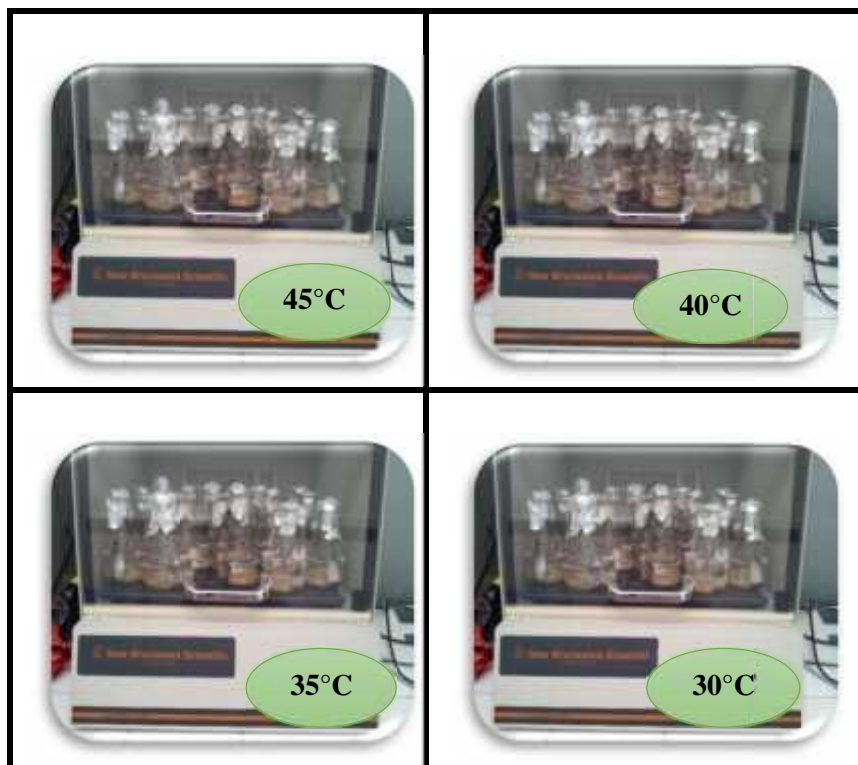


Figure 05 :Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml pour les quatre températures.

3. Méthodes de dosage

L'activité protéolytique a été dosée selon la même méthode décrite par LENOIR et AUBERGER (1977) et modifiée par MECHAKRA et *al.* (1999).

3.1. Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ;
- 1,5 ml du tampon Tris - HCl (0,2M / 0,1 M), pH8 ;
- 2,5 ml du substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M).

Après agitation et incubation 30 min au bain-marie à 40°C, la réaction a été arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace ou à 4°C (DEVI et *al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (SANDHYA *et al.*, 2005). Il a été ensuite filtré sur papier Whatman n° 1.

Le blanc a été préparé exactement de la même façon du mélange réactionnel excepté l'incubation au bain marie et le TCAa été rajouté avant le substrat.

3.2. Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'ANSON (1938). Pour cela, 0,5 ml du filtrat ont été mélangés avec 2,5 ml de Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4ème ont été ajoutés. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (PARANTHAMAN et al., 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm dans un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1280); l'activité a été calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (voir Annexe). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 μg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme

Chaque dosage a été effectué en deux répétitions.

4. Détermination du poids sec des plumes dégradées

Les papiers filtres retenus pour chaque souche après chaque fermentation ont été séchés à 60°C pendant 24 h. Le poids sec des plumes restantes a été estimé par élimination du poids sec des papiers filtres et ainsi le calcul du pourcentage du poids dégradé par soustraction.

5. Méthodes des tests

Dans cette partie, les extraits enzymatiques utilisés ont été ceux qui ont donné des activités protéolytiques importantes dans les différentes températures.

5.1. Test du délainage

Une pièce humide de peau de mouton avec laine (5 x 5 cm) a été incubée avec 10 ml de l'extrait enzymatique de chaque souche et 1,5 ml du tampon Tris-HCl, à 37°C sous agitation (150 rpm). Après 24 h d'incubation, les pièces de peau ont été prélevées et la laine a été enlevée délicatement à la main avec une spatule. L'efficacité de délainage a été évaluée en

fonction de la zone épilée de la peau à la fin du processus et la qualité de la peau épilée a été estimée à l'œil nu après traitement.



Figure 06 : Incubation des erlenmeyers pour le test de délainage.

5.2. Digestion des protéines naturelles

Deux échantillons protéiques ont été utilisés pour ce test : le blanc d'œuf et le sang coagulé. Pour cela, ils ont été mélangés avec les différents extraits enzymatiques testés selon le protocole suivant :

Echantillon du sang coagulé	Echantillon du blanc d'œuf
Dans un tube à essai : <ul style="list-style-type: none"> • 2ml du sang coagulé • 2ml de l'extrait enzymatique • 3ml du tampon Tris-HCl 	Dans un tube à essai : <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml de blanc d'œuf • 2ml de l'extrait enzymatique • 3ml du tampon Tris-HCl
Incubation pendant 12 heures à température ambiante	
Observation visuelle de la solubilisation	

Cette opération a été répétée en double pour chaque extrait.

5.3. Compatibilité avec des détergents commerciaux

L'effet des détergents commerciaux (ISIS et LE CHAT) sur l'activité des protéases alcalines a été étudié. Ces détergents commerciaux ont été dilués dans de l'eau du robinet avec

une concentration de 10 mg / ml. Les protéases endogènes contenues dans ces détergents ont été inactivées par chauffage des détergents dilués à 70°C pendant 1 h.

Après refroidissement, la solution de chaque détergent a été mélangée avec un extrait enzymatique testé (1:1). Ensuite, l'activité protéolytique résiduelle de ce mélange a été mesurée après une période d'incubation d'1 heure à 40°C selon la méthode décrite au dessus.



Figure 07 : Les deux détergents commerciaux choisis.

5.4. Analyse de la performance du lavage

La possibilité d'application des protéases alcalines avec les détergents a été testée sur des tissus de coton (5 x 5 cm) salis par le sang. Ces coupons ont été mis dans des flacons avec différentes solutions :

- Lavage par eau distillée : eau distillée (100 ml)
- Lavage par détergent LE CHAT : eau distillée (100 ml) + 1 ml du détergent (7 mg / ml).
- Lavage par extrait enzymatique : eau distillée (100 ml) + 2 ml d'un extrait.
- Lavage par détergent + extrait enzymatique : eau distillée (100 ml) + 1 ml du détergent (7 mg / ml) + 2 ml d'un extrait.

Le nombre des flacons des deux derniers lavages a été déterminé en fonction du nombre des extraits enzymatiques utilisés.

Tous les flacons ont été incubés à 45°C pendant 15 min. Par la suite, les tissus ont été rincés, séchés puis observés à l'œil nu pour voir l'effet des enzymes sur les taches (HADDARetal., 2011).



Chapitre 03

Résultats et Discussion

1. Présentation des résultats de fermentations

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus à partir des fermentations à différentes températures réalisées en erlenmeyers de 250 ml ; et qui ont permis après quelque jours, de récupérer des filtrats de culture pour chaque souche fermentée, utilisés ultérieurement pour le dosage enzymatique.

1.1. Résultats du pH

Chaque enzyme possède un pH optimum auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (HAMES *et al.*, 2006).

Tableau 05 : Résultats du pH pour les souches testé à différentes températures.

Températures Souches	30°C	35°C	40°C	45°C
<i>Aureobasidium</i> sp.	7,83	8,98	7,07	7,80
<i>Aspergillus</i> sp.2	8,71	8,93	6,68	8,29
<i>Trichoderma</i> sp.	7,78	8,43	7,10	8,32
<i>Aspergillus</i> sp.1	8,90	9,99	7,78	6,55
<i>Chrysosporium</i> sp.	8,22	9,27	6,55	6,44
<i>Penicillium</i> sp.	8,99	8,53	7,26	6,61
<i>Aspergillus</i> sp.3	8,76	9,20	6,73	8,02
<i>Aspergillus</i> sp.4	7,51	8,98	6,61	6,43
<i>Aspergillus</i> sp.6	8,42	8,63	7,14	7,98
<i>Aspergillus</i> sp.5	8,38	8,83	6,85	6,53
<i>Scedosporium</i> sp.	7,58	9,05	6,32	6,62

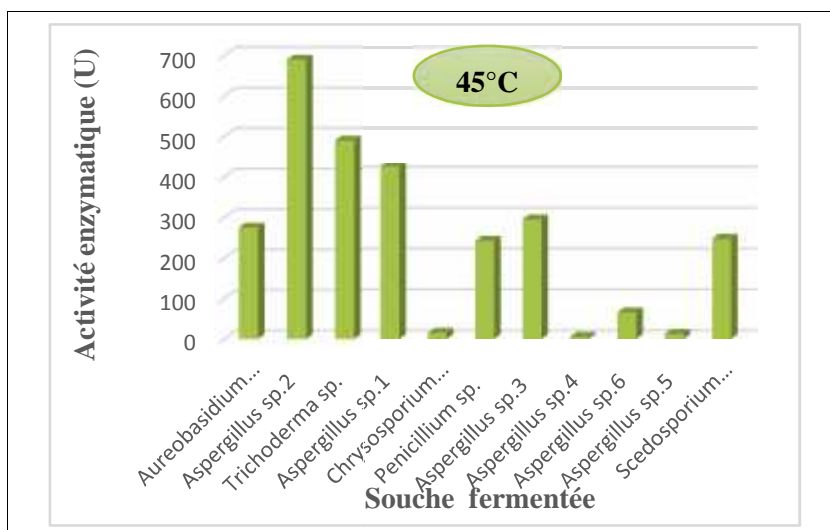
Le tableau ci-dessus, montre les variations du pH de la culture après fermentation dans une gamme de température de 30°C à 45°C avec un intervalle de 5°C.

D'après ce tableau, on remarque que le pH reste dans l'intervalle allant de 6 jusqu'à 9 sous les quatre températures. En parlant sur les températures 30°C et à 35°C, une augmentation significative du pH a été observée après 7 jours de fermentation pour l'ensemble de toutes les souches. Au contraire, une légère diminution à une stabilité du pH à la neutralité a été détectée à 40°C et à 45°C. L'augmentation s'explique par libération de molécules alcalines tels que l'ammoniaque résultant de la dégradation des protéines ; tandis que la diminution, par production d'acides organiques. Cela indique que les souches ont certainement utilisé différemment les plumes de poulet constituant la seule source de carbone et donc de protéines dans le milieu.

En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques car, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques (SANDHYA et al, 2005b).

Résultats de l'activité protéolytique

L'activité enzymatique testée dans le milieu de fermentation liquide à base de plumes de poulet a montré que la production de protéase alcaline diffère d'une température à une autre chez les différentes souches fongiques (Figure 08).



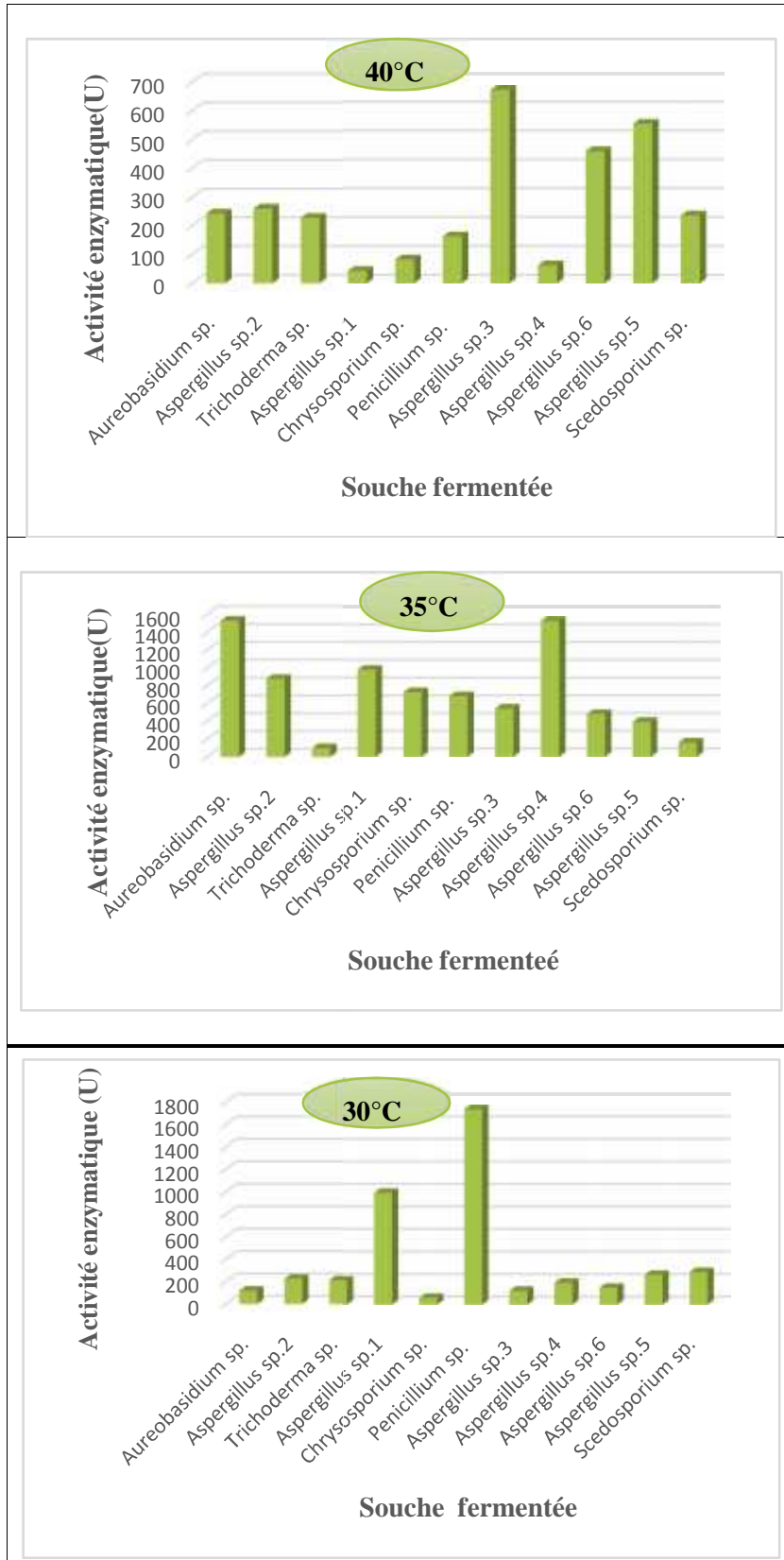


Figure08 : Résultats de l'activité protéasique pour les souches fermentées sous les quatre températures.

En commençant par la température 30°C, la meilleure activité est remarquée chez la souche *Penicillium sp.*(1733,75U), suivie par la souche *Aspergillus sp.1*(922,5 U). Les autres, présentent au contraire de très faibles activités (<300 U). En parallèle avec les résultats de cette température, des activités de l'ordre de 1000 U sont observées dans la température 35°C par les souches *Aureobasidium sp.*(1530U), *Aspergillus sp.4*(1530U) et *Aspergillus sp.1*(980U). Les souches *Aspergillus sp.2*, *Chrysosporium sp.*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.3* présentent respectivement des activités moyennes : (876,5U), (727,5U), (682,5U) et (542,5U) ; le reste montre de faibles activités.

Par ailleurs, les rendements maximaux en protéase alcaline sous les deux dernières températures sont constatés successivement chez les souches : *Aspergillus sp.3*(670U), *Aspergillus sp.5* (552,5U) et *Aspergillus sp.6* (457,5U) sous la température 40°C, et chez les souches : *Aspergillus sp.2*(690U), *Trichoderma sp.*(490U) et *Aspergillus sp.1*(422,5U) sous la température 45°C.

En effet, la comparaison des résultats de toutes les souches révèle que la meilleure activité protéolytique observée est celle obtenue par la souche *Penicillium sp.*(1733,75U) à la température 30°C.

1.2. Effet de la température sur la production de la protéase alcaline

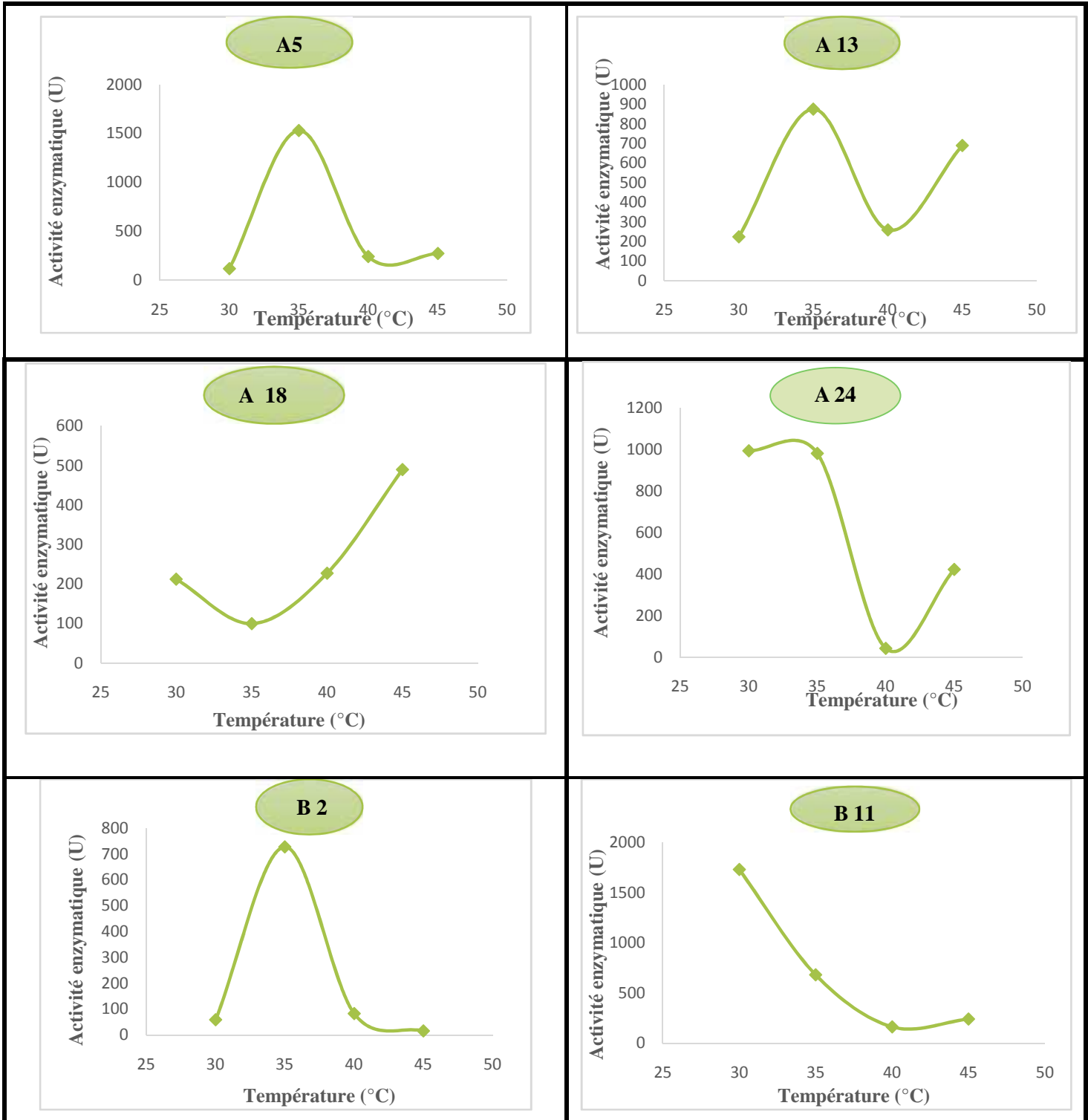
La température est un facteur important qui doit être contrôlé. La température optimale varie d'un organisme à l'autre (HAJJI *et al.*, 2008). Pour cela, la production de la protéase alcaline a été étudiée dans la plage de température de 30 à 45°C pour chaque souche (Figure 09).

L'analyse des graphes ci-dessous permet de discerner éventuellement la température optimale de la production de la protéase alcaline pour chaque souche utilisée. Les souches *Aureobasidium sp.*, *Aspergillus sp.2*, *Chrysosporium sp.*, *Aspergillus sp.4* et *Aspergillus sp.6* présentent un maximum de production à la température 35°C où elle est d'environ (1530 U), (876,5U), (727,5U), (1530U), (480U) et (160U), respectivement. En ce qui concerne les souches *Penicillium sp.* et *Scedosporium sp.* l'activité la plus élevée est observée sous la température 30°C ; (1733,75U) et (288,75U) successivement, tandis que pour les souches *Aspergillus sp.3*(670U) et *Aspergillus sp.5*, elle est observée sous la température 40°C ; respectivement 670U et 552,5 U.

Par ailleurs, la souche *Aspergillus sp.* 1 donne de bons rendements équitablement sous les deux températures 30°C (992,5U) et 35°C (980U), au-delà de cette température, l'activité protéolytique diminue considérablement. Par contre, la souche *Trichoderma sp.* donne son meilleur résultat (490U) sous la température 45°C.

Toutes ces différences de production entre ces souches affirment que la température influence la sécrétion extracellulaire des enzymes, éventuellement en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire. En effet, la température affecte fortement la synthèse d'une protéase, soit de manière non spécifique en influençant les taux de réactions biochimiques ou spécifiquement par induire ou réprimer leur production (NARDELLO-RATAJ et al., 2003).

Par conséquent, les activités protéolytiques les plus élevées sont observées sous la température 30 et 35°C vu le caractère mésophile des souches fongiques. En fait, la majorité des champignons kératinophiles sont mésophiles. Certains, comme *Chrysosporium keratinophilum*, *Ch. tropicum*, *A. fulvescens*, *Microsporium gypseum*, sont thermotolérants (GARG et al., 1985), moins fréquemment thermophiles (DOZIE et al., 1994). Une fréquence élevée de keratinomycetes thermotolérants est enregistré dans microhabitats tels que le plumage des oiseaux et les nids, ou les cheveux des mammifères (HUBALEK, 1974; HUBALEK et BALAT, 1974; PINOWSKI et al., 1999; KORNILLOWICZ-KOWALSKA et al., 2011).



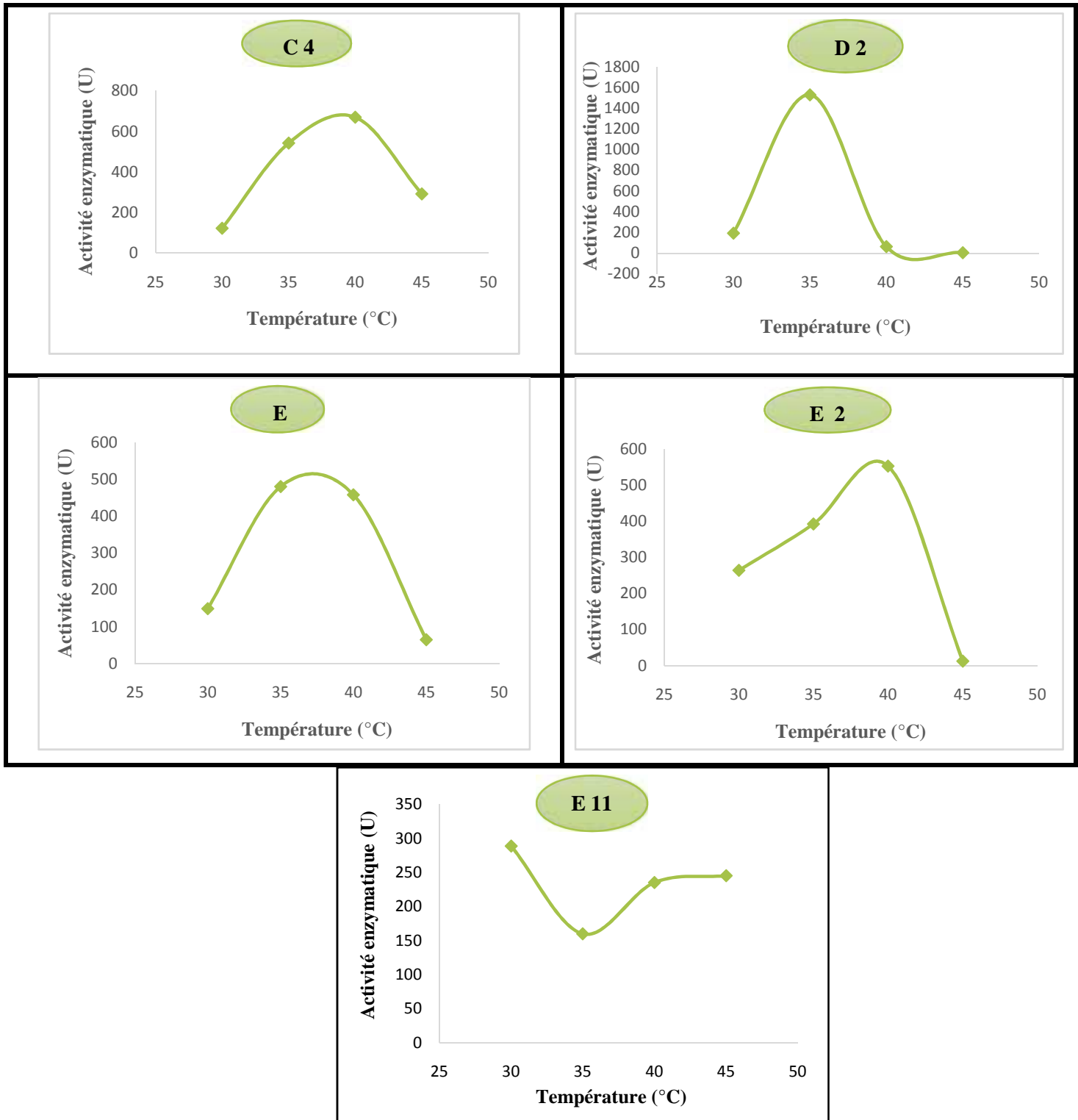


Figure 09 : Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les 11 souches.

1.3. Mise en évidence du pourcentage du poids dégradé des plumes (%)

Le tableau ci-dessous, représente la quantité des plumes qui a été dégradée par chaque souche utilisée. De ce fait, sous la température 30°C, la souche *Aspergillus sp.1* apparaît puissante où elle a dégradé environ 72 % des plumes contenues dans l'erlen, suivie par *Trichoderma sp.* (46,9 %), *Scedosporium sp.* (32,2 %) et *Penicillium sp.* (30,05 %). A la température 35°C, des pourcentages du poids de plumes dégradées importants sont détectés chez plusieurs souches, 80,2% chez *Aspergillus sp.4*, 75,7 % chez *Aureobasidium sp.*, 69,6 % chez *Aspergillus sp.2* et 51,8 % *Aspergillus sp.1*.

Tableau 06 : Pourcentage du poids des plumes dégradées par chaque souche après fermentation sous les quatre températures.

Poids dégradé %				
Températures Souches	30°C	35°C	40°C	45°C
<i>Aureobasidium sp.</i>	16,3	75,7	10,6	33,6
<i>Aspergillus sp.2</i>	12,5	69,6	17,7	33,4
<i>Trichoderma sp.</i>	46,9	21,5	15,5	18,6
<i>Aspergillus sp.1</i>	72,8	51,8	23,2	14,6
<i>Chrysosporium sp.</i>	28,3	35,6	24,6	6,6
<i>Penicillium sp.</i>	30,05	23	29,6	15,6
<i>Aspergillus sp.3</i>	27,25	30	43,1	17,6
<i>Aspergillus sp.4</i>	8,8	80,2	25,3	14,6
<i>Aspergillus sp.6</i>	22,95	34,2	89,1	16,6
<i>Aspergillus sp.5</i>	19,8	33,9	47,8	11,6
<i>Scedosporium sp.</i>	32,2	24,9	20,6	5,6

A la température 40°C, la souche *Aspergillus sp.6* présente un pourcentage élevé de dégradation des plumes (89,1 %), suivie par la souche *Aspergillus sp.5* (47,8%). Concernant la température 45°C, pas de teneurs vraiment considérables en poids de plumes dégradées sont constatées. Cependant, la souche *Aureobasidium sp.* présente une teneur moyenne de 33,6 % et

également pour la souche *Aspergillus sp.2* (33,4 %). En ce qui concerne le reste des souches, une dégradation des plumes assez faible est constatée.

Etant donné que les plumes de poulet sont constituées d'environ 90% de protéines (ONIFADE *et al.*, 1998) et ces protéines sont reconnues des kératines. Comme il en résulte plusieurs souches ont la capacité de dégrader les plumes de poulet mises dans des erlens, on peut considérer ces souches comme forte productrices des kératinases.





2. Résultats des tests

Les souches qui ont donné des activités importantes en protéase alcaline, leurs extraits enzymatiques ont été choisis pour réaliser quelques tests sur lesquels.

2.1. Test du délainage

L'incubation des protéases alcalines avec la peau du mouton afin de faire le délainage a montré après 24 h d'incubation à 37°C sous agitation, que la laine a été enlevée par tous les extraits protéolytiques testés en comparant avec le contrôle, sans endommager le collagène (Figure 10), sachant qu'on peut diviser les résultats en quatre observations :

- Délainage très facile : par les protéases des souches suivantes : *Aspergillus sp.4* à 35°C, *Penicillium sp.* à 30°C, *Aspergillus sp.1* à 30°C, et *Aspergillus sp.1* à 35°C.
- Délainage facile : par les protéases des souches suivantes : *Aspergillus sp.2* à 35°C, et *Aspergillus sp.6* à 40°C.
- Délainage difficile : par les protéases des souches suivantes), *Aureobasidium sp.* à 35°C et *Aspergillus sp.3* à 40°C.
- Délainage très difficile : par les protéases des souches suivantes : *Aspergillus sp.2* et *Trichoderma sp.* à 45°C.

30°C	35°C	40°C	45°C
<p data-bbox="226 383 399 443">Contrôle</p> 	<p data-bbox="564 383 737 443">Contrôle</p> 	<p data-bbox="880 383 1053 443">Contrôle</p> 	<p data-bbox="1270 383 1442 443">Contrôle</p> 
<p data-bbox="226 965 357 1025">B '11</p> 	<p data-bbox="549 965 692 1025">A '13</p> 	<p data-bbox="916 965 1050 1025">E</p> 	<p data-bbox="1305 965 1433 1025">A '18</p> 

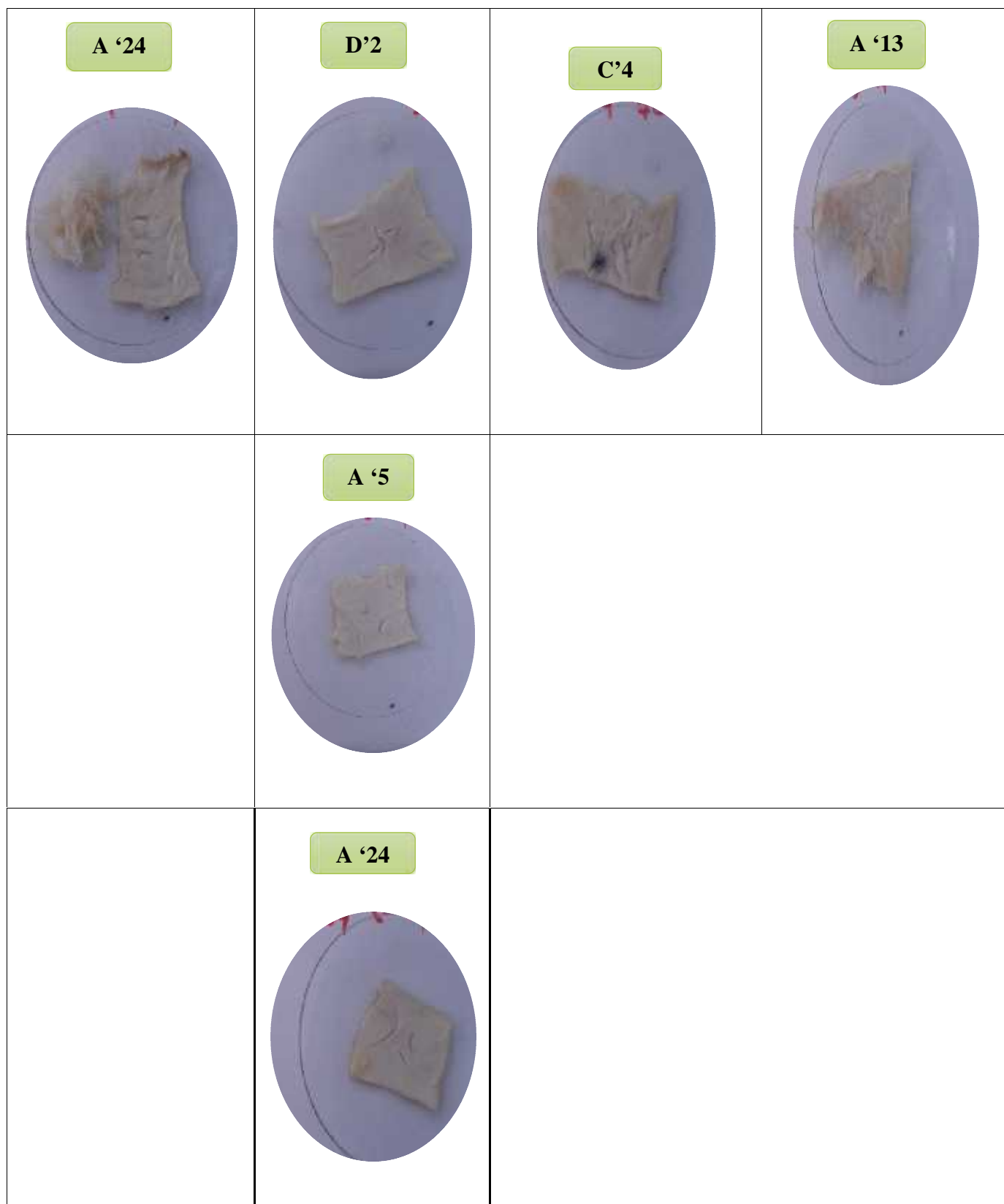


Figure 10 :Résultats du délainage pour les extraits enzymatiques testés.

Des résultats similaires ont été annoncés par la littérature. A savoir, DAYANANDAN et *al.* (2003) qui rapportent une épilation facile de la peau bovine après 24 h d'incubation à pH 9,5 et à 30 ou 37°C par une préparation enzymatique par les souches de *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*. De même, les mêmes auteurs indiquent une même observation par une protéase alcaline d'*Aspergillus tamarii* sur la peau de chèvre à 30~37°C, pH 9,0~11 (JAOUADI et *al.*, 2009).

Il est à noter que généralement les kératinases sont décrites comme des enzymes alcalines ou neutres avec un optimum de pH compris entre 7,5 et 9 (SELVAM et VISHNUPRIYA, 2012).

2.2. Digestion des protéines naturelles

L'analyse des résultats mentionnés dans la Figure 11 montre que tous les extraits enzymatiques testés ont la capacité de dissoudre rapidement le blanc d'œuf après 12h, où toutes les solutions apparaissent limpides. Ces résultats deviennent visibles à l'œil nu dès les premières heures d'incubation et encore bien après 12 h. Ces protéases peuvent agir donc comme un agent digestif. Nos observations corroborent celles notées par SEN et *al.* (2011).

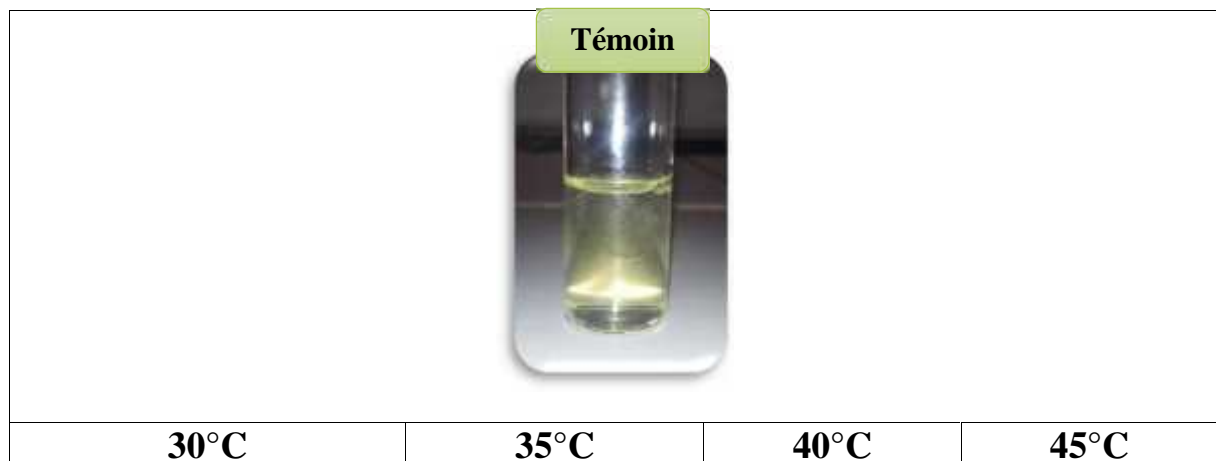
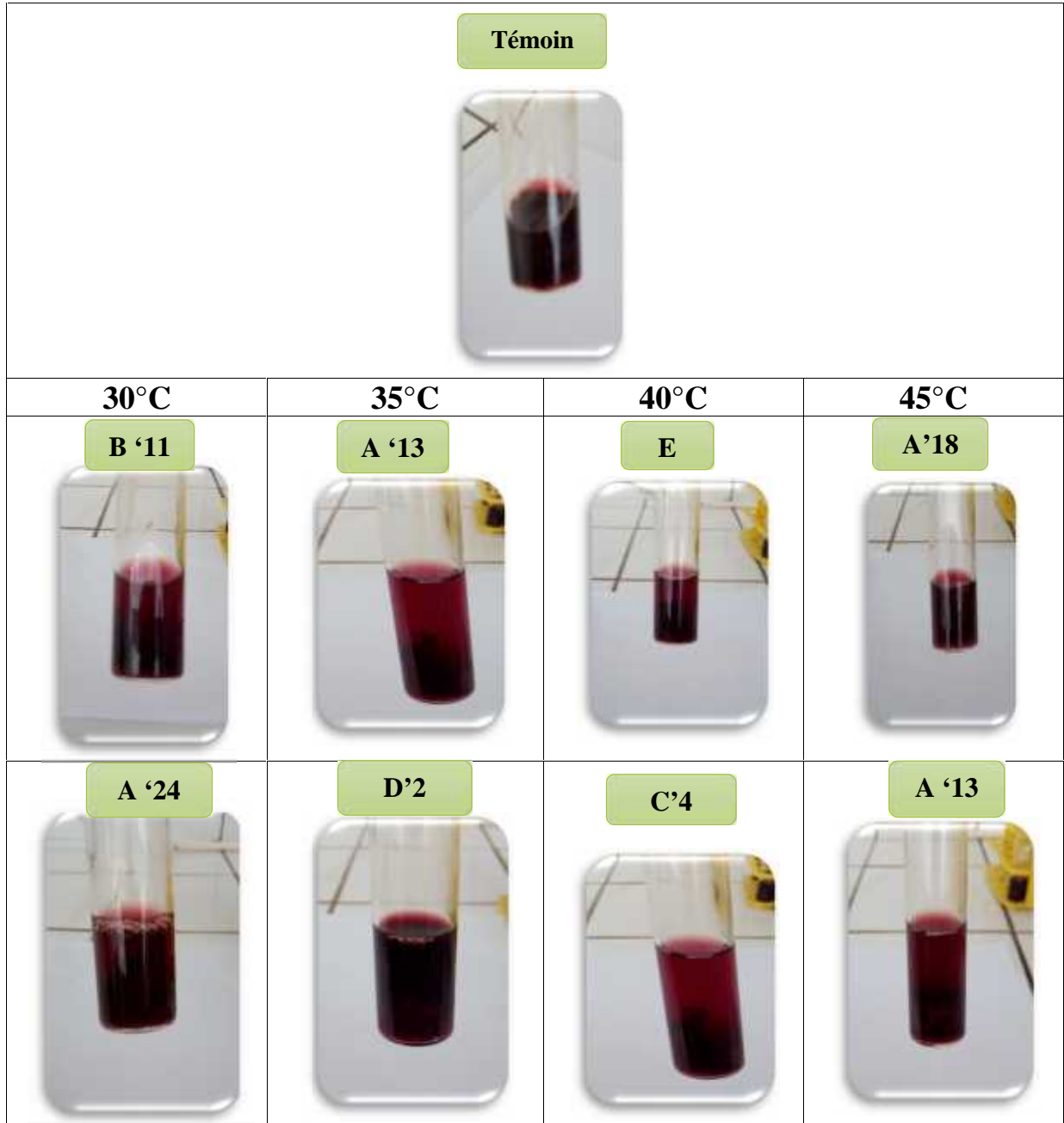




Figure 11 :Résultats de la digestion des protéines (cas du blanc d'œuf).

Par ailleurs et d'après la Figure 12, les extraits d'*Aspergillus sp.2* à 35°C et à 45°C, d'*Aspergillus sp.3* à 40°C, d'*Aspergillus sp.6* à 40°C, révèlent une bonne solubilisation du sang coagulé mais assez lente. Le reste, d'*Aspergillus sp.1* à 30°C, *Penicillium sp.* à 30°C, *Aspergillus sp.1* à 35°C, *Aureobasidium sp.* à 35°C, *Aspergillus sp.* à 35°C, et *Trichoderma sp.* à 45°C, présente une solubilisation mais pas tellement. Pour cela, les extraits qui peuvent agir comme agent anticoagulant sont ceux qui présentent une digestion claire.



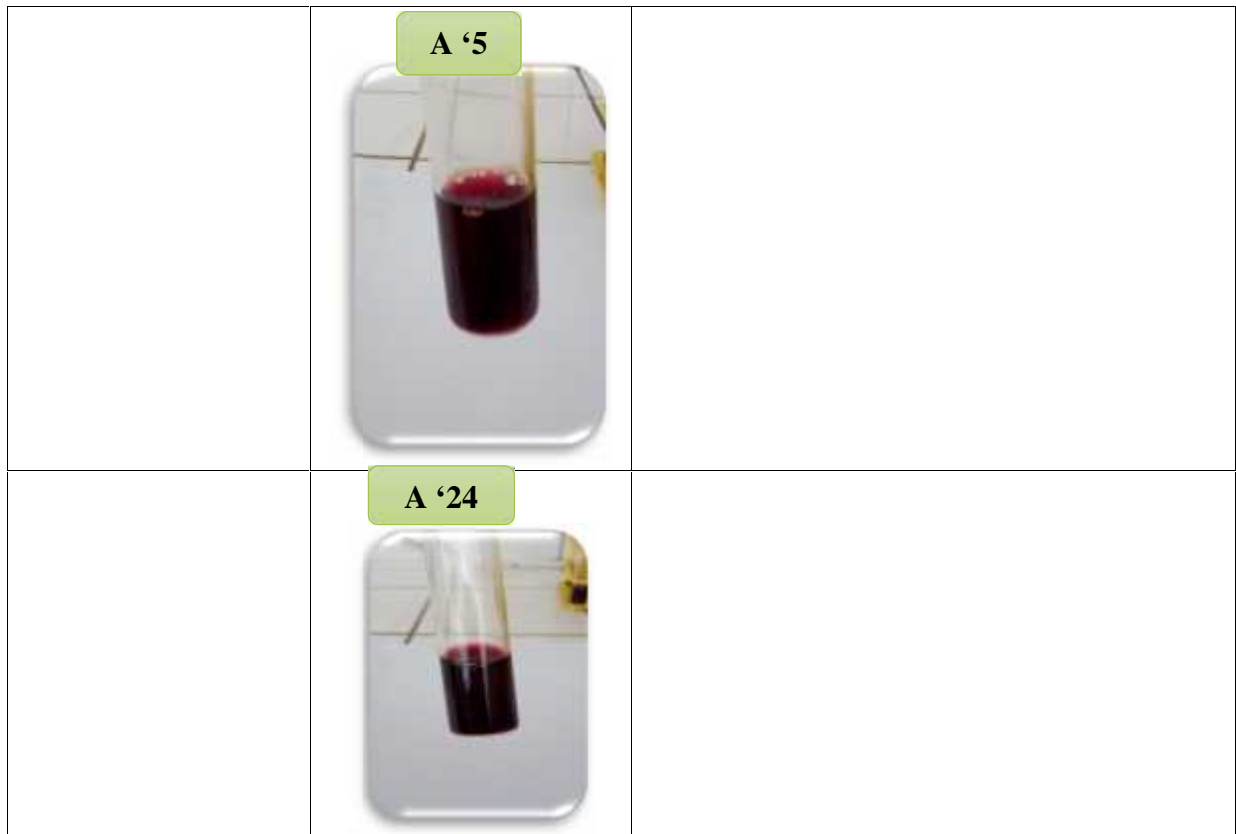


Figure 12 : Résultats de la digestion des protéines (cas du sang coagulé).

2.3. Compatibilité avec les détergents commerciaux

La compatibilité de chaque extrait brut de la protéase alcaline avec des détergents à lessive solides a été vérifiée en incubant ces extraits 1 h à 40°C en présence de deux détergents commerciaux *ISIS* et *LE CHAT*. Les données présentées dans la Figure 13 montrent que les extraits exposent une stabilité avec *LE CHAT* par rapport à l'autre détergent *ISIS*.

Par conséquent, les protéases brutes qui ont pu garder 100 % de leurs activités protéolytiques en présence du détergent *LECHAT*. après 1 h d'incubation à 40°C, sont celles d'*Aspergillus sp.1* (35°C) et d'*Aspergillus sp.3* (40°C). Par ailleurs, l'activité a été maintenue 99 % pour l'extrait d'*Aspergillus sp.4* (35°C), 86.60 % pour l'extrait d'*Aureobasidium* (35°C) et 55.54 % pour l'extrait d'*Aspergillus sp. 1* (30°C), tandis que le reste des extraits enzymatiques a perdu plus de 50 % d'activité. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par JAOUADI et *al.* (2009).

En revanche, aucune stabilité n'a été observée avec le détergent *ISIS*.

Etant donné que l'activité protéolytique varie avec chaque détergent à lessive, les résultats obtenus ont clairement indiqué que les performances des enzymes dans les détergents dépendent de plusieurs facteurs, y compris les composants des détergents.

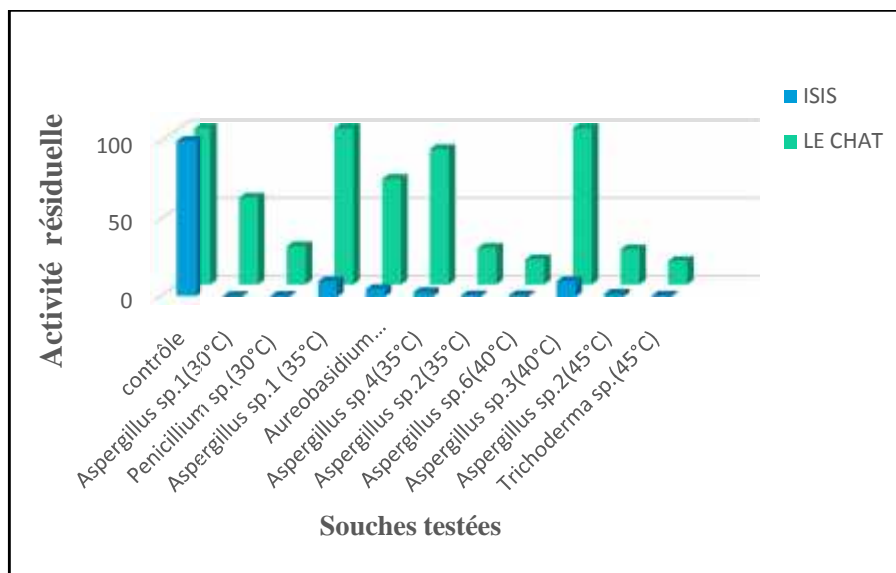


Figure 13 : Stabilité des extraits de la protéase alcaline des souches fongiques en présence des détergents commerciaux solides.

1.1. Test de lavage

L'activité la plus importante industriellement est l'activité détergente. Pour cela, les extraits protéolytiques des souches fongiques sont appliqués sur des pièces de coton tachées du sang. Les résultats de ce test sont résumés dans les Figures 14 et 15.

Pour les pièces lavées par l'extrait enzymatique seul, où les pièces du coton sont imbibées d'eau avec l'extrait enzymatique, on observe des traces du sang légèrement diminuées par l'action des protéases alcalines, notamment par les extraits d'*Aspergillus sp.4* (35°C). En revanche, les extraits d'*Aspergillus sp.1* (35°C) présentent un bon lavage ; une très légère trace, voir, non observable.

Dans le 2ème cas, les taches du sang diminuent fortement lorsque la pièce du coton est déposée dans la solution du détergent commercial ayant permis de garder des activités protéolytiques importantes, c'est-à-dire "LE CHAT".

De l'autre côté, aucune trace de sang n'est observée dans le cas où chaque extrait enzymatique est mélangé avec la solution du détergent "LE CHAT", on obtient alors une disparition complète de la tache de sang, ce qui indique un nettoyage total. Ceci est confirmé par les travaux d'EL-HADJ ALI et *al.* (2011).

Témoin Pièce + eau distillé		Témoin Pièce + eau distillé + détergent	
30°C	35°C	40°C	45°C
B '11	A '13	E	A'18
A '24	D'2	C'4	A '13

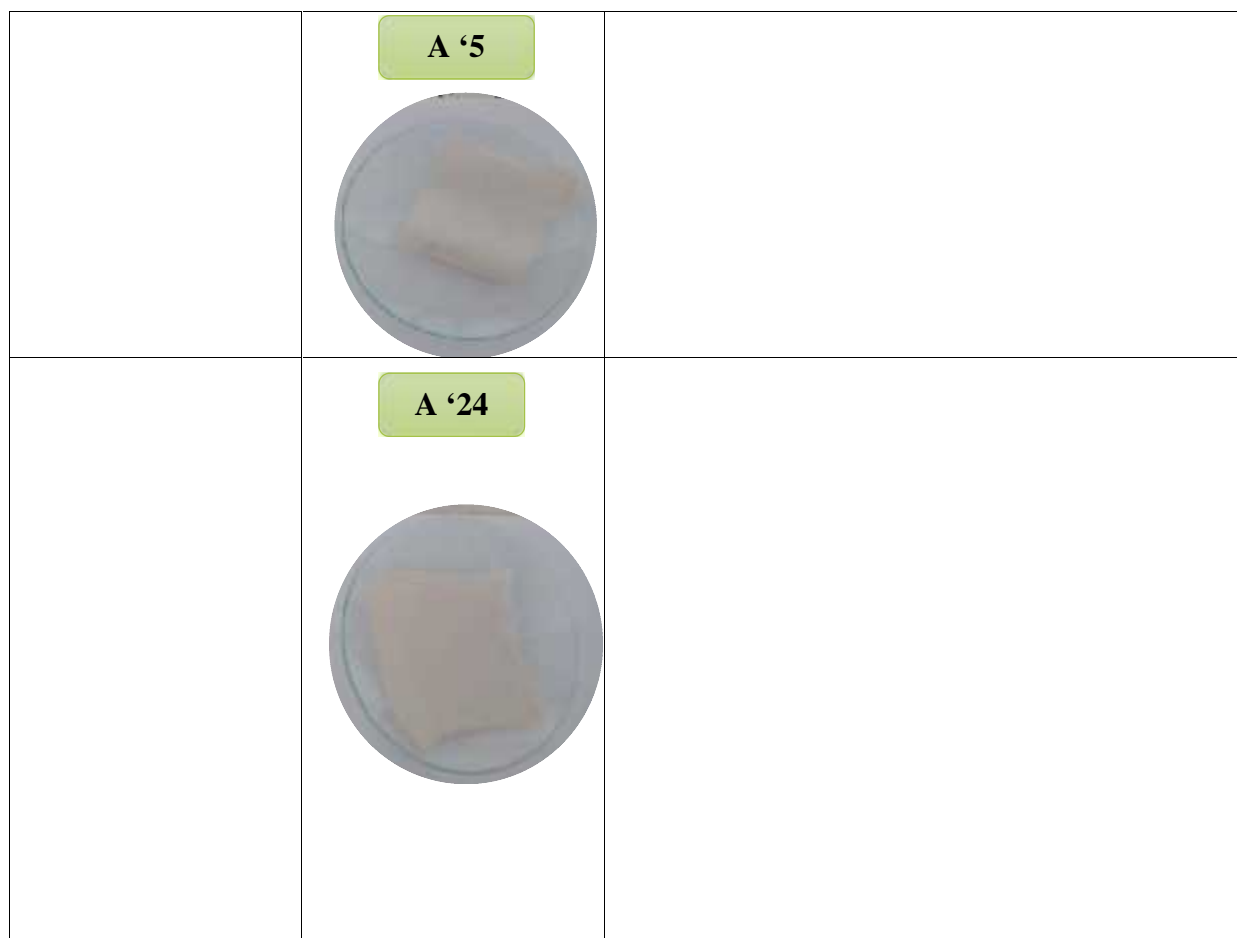
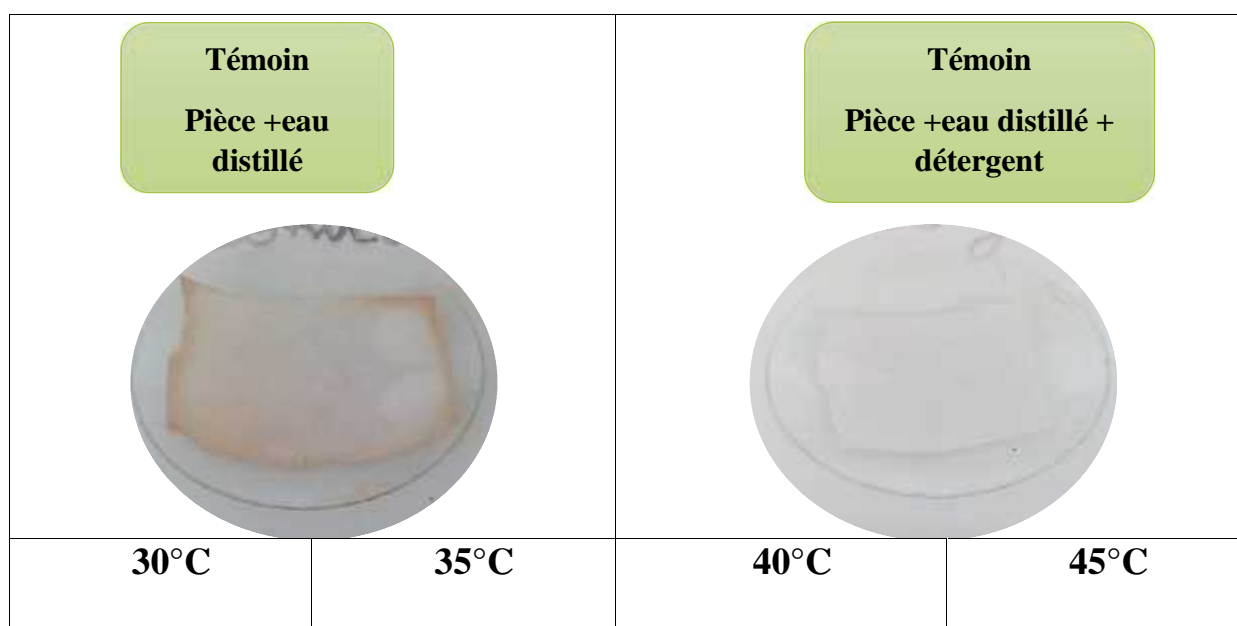


Figure 14 :Résultats des pièces lavées par l'extrait enzymatique seul.



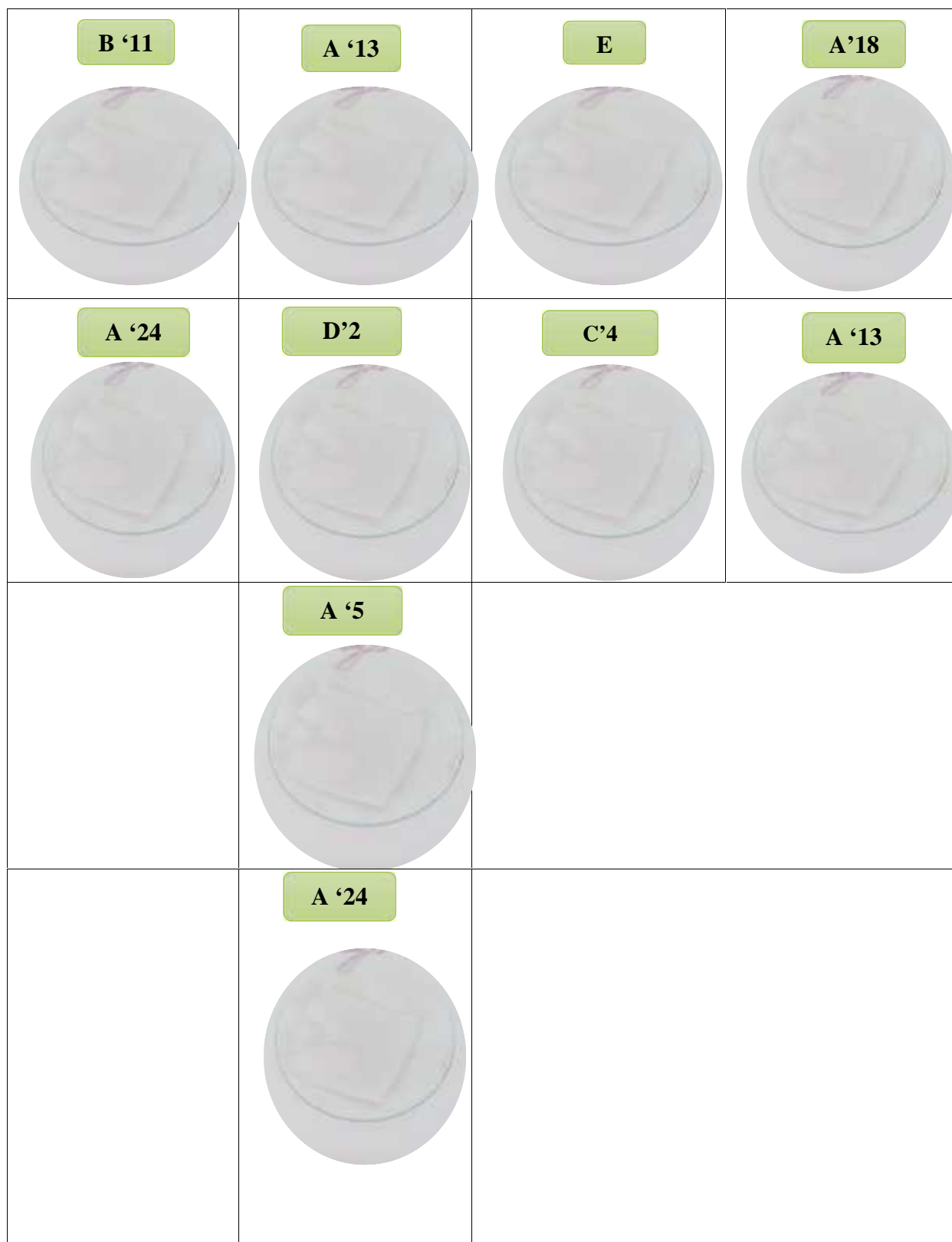


Figure 15 :Résultats des pièces lavées par extrait enzymatique et solution du détergent
 “LE CHAT”.



Conclusion

Conclusion Générale

L'industrie des volailles a connu un développement très considérable ces dernières années, générant des millions de tonnes de plumes comme déchets. Ces derniers sont en majeure partie composés de kératine, une protéine très résistante et stable, et sont difficiles à être dégradés. Par conséquent, ils sont jetés aux décharges publiques ou incinérés, ce qui provoque des problèmes environnementaux. En effet, dans le cadre de valoriser ce type de déchet, des plumes de poulet ont été utilisées dans ce travail comme substrat de base pour influencer la production de la protéase alcaline.

L'effet de la température sur cette production a été étudié par réalisation des fermentations en erlenmeyers de 250 ml, contenant chacun une quantité de plumes de poulet plus un volume d'eau distillée. Pour cela, des inocula de onze souches de moisissures ont été utilisés pour ensemercer le milieu décrit au-dessus afin de tester la capacité de celles-ci à dégrader ces plumes. Ces cultures ont été incubées pendant sept jours à différentes températures (30, 35, 40 et 45°C). L'analyse des résultats a révélé que les meilleures activités protéolytiques sont obtenues à 30°C et notamment à 35°C affirmant le caractère mésophile des moisissures. De ce fait, les valeurs de ces activités sont pour *Penicillium sp.* : 1733,75 U à 30°C, pour *Aureobasidium sp.* : 1530 U à 35°C et pour *Aspergillus sp.4* : 1530 U à 35°C.

Afin d'apprécier le niveau de la dégradation des plumes mises dans les erlens, des mesures du poids sec des plumes dégradées révèlent un pouvoir dégradant élevé par les souches : *Aspergillus sp.1* (72,8%) à 30°C, *Aspergillus sp.4* (80,2%) à 35°C, *Aspergillus sp.6* (89,1%) à 40°C et *Aureobasidium sp.* (33,6%) à 45°C. Ces dernières sont considérées comme des souches kératinolytiques vu la richesse des plumes en kératines (91%) constituant les protéines de ce substrat. Ces résultats permettent de considérer les plumes de poulet comme un substrat favorable pour la production des kératinases.

Les souches qui n'ont pas donné des rendements importants sous toutes les températures testées ne sont plus considérées comme des souches kératinolytiques.

Par la suite, la comparaison des résultats du dosage enzymatique permet de ressortir dix extraits enzymatiques présentant des activités protéolytiques élevées. Ces extraits ont été sélectionnés pour réaliser des tests d'application.

En tannerie, des protéases interviennent lors du traitement du cuir afin de faciliter le l'épilation. A cet égard, les extraits enzymatiques sélectionnés ont été incubés avec des pièces de peau dumouton dans des conditions alcalines. L'observation à l'œil nu de ces pièces après 24 h a montré que ces protéases constituent des excellents agents de délainage en raison de l'épilation facile des peaux testées par la totalité des extraits, particulièrement : d'*Aspergillus sp.4* (35°C), de *Penicillium sp.* (30°C), d'*Aspergillus sp.1* (30°C) et d'*Aspergillus sp.1* (35°C).

En ce qui concerne leurs capacités à solubiliser le blanc d'œuf et ainsi le sang coagulé, toutes les protéases alcalines montrent un grand pouvoir de digestion du blanc d'œuf. Cependant, seulement quelques unes ont pu dissoudre les caillots du sang ; qui sont les extraits d'*Aspergillus sp.2* à 35°C et à 45°C, d'*Aspergillus sp.3* à 40°C et d'*Aspergillus sp.6* à 40°C, ceux-ci pourraient être utilisés comme agents anticoagulants.

Les protéases alcalines ajoutées aux détergents liquides et solides jouent un rôle catalytique dans l'hydrolyse des taches de protéines tels que le sang, le lait, etc. En effet, la stabilité des protéases alcalines contre des échantillons de détergents commerciaux a été étudiée en utilisant *ISIS* et *LE CHAT*. Le dosage enzymatique indique que les extraits d'*Aspergillus sp.1* (35°C) et d'*Aspergillus sp.3* (40°C) ont pu garder 100% de leurs activités initiales.

Afin d'évaluer la performance du lavage des extraits enzymatiques choisis, ils ont été incubés avec des tissus de cotons tachés par le sang. En fait, toutes les préparations enzymatiques ont facilité la libération du matériel protéinique de la tâche du sang, en particulier par l'extrait d'*Aspergillus sp.1* (30°C). En outre, la combinaison de chaque extrait avec la solution du détergent *LE CHAT* a entraîné une élimination complète des taches du sang. Cette activité indique que l'extrait enzymatique seul ne donne pas un excellent résultat de lavage. Telles protéases pourraient être utilisées comme additifs bio-détergents.

Au terme de cette ébauche, nous avons jugé utile de se fixer certains points comme perspectives :

- Etudier la stabilité de ces protéases alcalines brutes dans une gamme de pH de 8,0 à 11,0 et ainsi vis-vis des agents oxydants et tensio-actifs pour être utiles comme additif aux détergents.
- Identifier les kératinases présentant une activité délainage mais aucune activité collagénolytique.
- Tester ces enzymes à l'échelle semi-industrielle dans le traitement local du cuir.



Références Bibliographiques

- ABIDI F., LIMAM F., NEJIB M., 2008.** Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economicraw materials: Assay as biodetergent. *Proc Biochem*, 43; 1202–1208.
- ADRIANO P., LUISA S., SUSANA J. 2015.** Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste intoadded-value products. *Food Research International* ,73; 3–12.
- AGUILAR C.N., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ G., RADO-BARRAGÁN P.A., RODRÍGUEZ-HERRERA R., MARTÍNEZ-HERNANDEZ J.L., CONTRERAS-ESQUIVEL J.C., 2008.** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol*, 4(4); 354-366.
- AMOURA A., BAZ S., 2014.** Identification des souches fongiques productrices desprotéases, isolées à partir de source chaude.*Mémoire de Master. Univ. Constantine 1.Constantine. Algérie.*
- ANDERSEN L.P.,1998.** Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes.USPatent.5; 834-299.
- ANSON M.L., 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol*, 22; 79–89.
- BELITZ H.D., GROSCH W., AND SCHIEBERLE P., 2009.** Food chemistry. 4èmeEd Springer Verlag Berlin, P.1070.
- BENEDYKT W. AND KATARZYANA P., 2008.** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13: 212-229.
- BERNAL C., CAIRO J., COELLO N., 2006.** Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enz Microb Technol*,38 ; 49 -54.
- BOIRON P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle.2ème édition. Masson. Paris. p. 16-41 ; 110 ; 364.
- BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J., 1989.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

- CALK P., TAKAÇ S., CALK G. ; OZDAMAR T. H., 2000.** Serine alkaline protease overproduction capacity of bacillus licheniformis. *enz. microbiol.Technol*, 26(1). 45-60.
- CHELLAPPAN S., JASMIN C., BASHEER S.M., ELYAS K.K., BHAT S.G., M. CHANDRASEKARAN M., 2006.** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem*, 41; 956–961.
- CHIA-MING C. 2009.** Purification and characterization of a keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* PU-LS07. *Mémoire de Maitrise. Institut de recherche alimentaire et la nutrition, Université Providence. Chine.*
- CORAL G., ARIKAN B., ÜNALDI M. N.; GÜVENMEZ H. 2003.** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4): 491-498.
- COUSIN D., MATAGNE A., LAEMMLI U. K. ; STEWART D. J. 1982.** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34. 1157-1166.
- DALEV P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol*, 48 ; 265–267.
- DAVET P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.
- DELGADO-JARANA J., RINCON A. M. , BENITEZ T. 2002.** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*, 148 : 1305-1315.
- DESMAZEAUD M., ET HERMIER J., 1978.** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8(4). 565-577.
- DEVI M.K., BANU A.R., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V., PALANISWAMY M., 2008.** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol*, 1(7) ; 1–6.

Fabrication et restauration du cuir (page consultée le 15 novembre 2013. [en ligne]

Adresse URL : <http://marrakech-cuir.blogspot.com/>

FAKHFAKH-ZOUARI N. 2010. Kératinases de *Bacillus licheniformis* RPK et *Bacillus pumilus* A1: production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques.

Thèse de Doctorat. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie.

FILIPELLO MARCHISIO, V., 2000. Karatinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: Kushawaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Rev. Iber. Micol*, 17.

FRAZIER W. C. 1967. Food microbiology. Academic presse. London. P: 3-429.

GEORGE S., RAJU V., KRISHNAN M.R.V., SUBRAMANIAN T.V., JAYARAMAN K., 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem*, 30; 457–462.

GUIRAUD J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.

GUPTA R., BEG Q.K., LORENZ P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 59; 15–32.

GUPTA, R ; RAMNANI, P. appl microbial biotechnol. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **2006.** 70. p21-33.

HAINES, ROLAND J. Ferme à la fourchette une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en ontario. Toronto, Imprimeur de la Reine pour l'Ontario, 2004. 654p. ISBN : 0-7794- 6428- 1.

HAJJI M., REBAI A., GHARSALLAH N. AND NASRI M. 2008. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 915-923. Sumantha A., Larroche C., Pandey A., 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol*, 244; 211–220.

HAMES B. D., HOOPER N. M. .; HOUGHTON J. D. 2006.L'essentiel en biochimie. *Ed BERTI Editions, Paris*, P.413.

ICHIDA J.M., KRIZOVA L., LEFEBVRE C.A., KEENER H.M., ELWELL D.L., BURT JR E.H., 2001.Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods*, 47; 199–208.

IGNATOVA Z., GOUSTEROVA A., SPASSOV G., NEDKOV P. 1999. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can J Microbiol.* 45: 217-222.

JACQUES C. 2003. Etude de la valorisation des déchets d'origine keratinique par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filaments continus : cas spécifique de la laine. Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. *Toulouse : L'institut national polytechnique de Toulouse.* 2003. 279p.

JAOUADI B. 2009. Protéases alcalines de *Bacillus licheniformis*: Production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques. *Thèse de Doctorat. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie.*

JULIEN R. 2002. Les moisissures parlons-en. *Objectif prévention.*25 (4): 7-8.

KALPANA DEVI A., RASHEEDHA BANU G., GNANAPRABHAL B. ., PRADEEP ., PALANISWAMY M., 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Vol.1 No 7.

KANNAPPAN, S; BAAHRATHI, D. Journal of textile and apparel, technology and management. Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber. 2012. 7. 3. p1-6.

keratinophilic fungi inhabiting a gelatin factory. *Mycopathology* 188, 147–152.

KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T., 1997. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. P.I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol.* 32, 51–79.

KRESZE G. B. (1991). Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12. 85-120.

- LASEKAN A., ABU BAKAR F., HASHIM D., 2013.** Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management* 33 ; 552–565.
- LENOIR J., AUBERGER B., 1977.** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*, II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57; 471-489.
- MALVIJA ,H.K., HASIJA, S.K., RAJAK, R.C., 1992.** In vitro utilization of L-cystine by
- MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F., LENOIR J., 1999.** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, 19; 663–675.
- MECHAKRA-MAZA A., GHERIBI-AOULMI Z., MERAIHI Z., BOUSSABOUA H., 2002.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger*. *Sci. Technol.*, 59-63.
- MECHEHALEH F., YEKHLEF M., 2015.** Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet. *Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine*.
- MEUNIER N., 1999.** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, *Université du Québec, Canada*. 168-173.
- MUKHERJEE A.K., ADHIKARI H., RAI S.K., 2008.** Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochem. Eng. J.*, 39; 353–361.
- NEELAKANTAN S., NOHANTY A. K., AND KAUSHIK J. K. 1999.** Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Sciences*, 77. 143-148.
- NICKLIN J., GRAEME-COOK K., PAGET T., KILLINGTON R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.
- ONIFADE, A; A1-SANE, NA ; AI-MUSALLAM, AA ; AL-ZARBAN, S.** Bioresource Technology. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-

degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. 1998. 66. P1-11.

OSCAR MARTÍNEZ A ., SUSANA C ., AGUSTÍN B., 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding. *Food Research International* ,73; 204–212.

OULED HADDAR, H., ZAGHLOUL, T., SAEED, H., 2009. Biodegradation of native featherkeratin by *Bacillus subtilis* recombinant strains. *Biodegradation* 20, 687–694.

PARANTHAMAN R., ALAGUSUNDARAM K., INDHUMATHI J., 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci*, 5(3); 308-312.

PARKS C.L. 1997. Handbook of microbiological media. Second edition by CRC. P 339-400.

PELMONT J., 1995. Enzymes : catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble*. p. 7 ; 621 ; 652–654.

PERRY J.J., STALEY J.T., LORY S., 2004. Microbiologie. Sinauer associates. Paris. pp. 575–576. Madigan M.T., Martinko J.M., 2007. Biologie des microorganismes. 11^{ème}. Pearson Education. Broek. France. pp. 478; 479.

PILLAI P., MANDGE S., ARCHANA G 2011. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry* 46; 1110–1117.

PILLAI P., MANDGE S., ARCHANAG., 2011. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biotechnol.*, 46; 1110–1117.

RAI, S. K., & MUKHERJEE, A. K. (2010). Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 173–180.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62; 597–635.

- REDDY L.V.A., WEE Y.-J., YUN J.-S., RYU H.-W., 2008.** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and responsesurface methodological approaches. *Bioresour. Technol*, 99; 2242–2249.
- SAHA, Subhasish.** Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement. *Thèse de doctorat en microbiologie. Inde : Bharathiadasan university.* 2009. 142p.
- SANDHYA C., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A., 2005a.** Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
- SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G., PANDEY A., 2005b.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40 ; 2689–2694.
- SANGALI, S., BRANDELLI, A., 2000.** Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio sp.* Strain kr2. *J.Appl. Microbiol.* 89, 735–743.
- SANTOS, R.M.D.B., FIRMINO, A.A.P., DE SA, C.M., FELIX, C.R., 1996.** Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus*. *Current Microbiol.* 33, 364–370.
- SCRIBAN R. 1993.** *Biotechnologie.4emeédition.Technique et Documentation.Lavoisier.* Paris. P. 30-695.
- SEN S., VENKATA D., DUTTA K. ET MANDAL B. 2011.**Characterization of novel surfactant andorganic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus psidofirmus* SVB1. *Research Journal of Microbiology*, 6(11): 769 -783.
- UL-HAQ I., MUKHTAR H., DAUDI S., SIKANDER A., QUADEER M. A. 2003.** Production of proteases by a lacally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology.* 2(1). 30-36.
- URBANEK H., YIRDAW G. 1984.** Hy drol y tic ability of acid protease of *F usa r ium culmor umand* its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbial. Pol.* 33 (2): 131.
- VISHWANATHA K. S., APPU RAO A. G., SINGH S. A. 2009.** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407.

- WALKER G.M., WHITE N.A., 2005.** Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications. John Wiley & Sons Ltd. England. p; 2.
- WANG R., LAW R.C.S., WEBB C., 2005.** Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 217–227.
- WILKESMAN J., KURZ L. 2009.** Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 175-184.
- ZHU, G., ZHU, X., WAN, X., FAN, Q., MA, Y., QIAN, J., LIU, X., SHEN, Y., JIANG,J.,2010.**Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids insubcritical water. *J. Anal. Appl. Pyrol*, 88, 187–191.



Annexes

Annexe 01 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 1 heure.
- D'autre part, faire fondre l'agar-agar dans 500 ml d'eau distillée chaude.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Ajuster le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121°C/20 min.

Annexe 02 :Eau Physiologique

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0,9% (masse/volume) de NaCl, soit 9 g.l 1).

Annexe 03 : Protocole de dosage de l'activité enzymatique

• Solution nécessaires

- Solution de caséine 2.5% dissoute dans citrate de sodium 0.02M.
- Tampon Tris - HCl (0,2M / 0,1 M), pH 8.
- Solution mère de la tyrosine avec une concentration de 100µg/ml pour l'étalonnage.
- Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.
- Solution de Na₂ CO₃ 15% (w/v) dans du NaOH 0.1N.

- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/4 éme.

❖ Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé en deux étapes :

La 1ère étape étant la réaction enzymatique ; dont le mélange réactionnel est constitué de :

- 1ml de l'extrait brut.

- 1.5ml du tampon Tris - HCl (0,2M / 0,1 M), pH 8.

- 2.5ml de la solution de la caséine à 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.

Après incubation 30 min au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA (4%). Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la même méthode décrite par LENOIR et AUBERGER (1977) et modifiée par MECHAKRA et *al.* (1999). La lecture de la densité optique se fait à 750 nm.

La 2ème étape pour le blanc :

Le blanc a été préparé exactement de la même façon du mélange réactionnel excepté l'incubation au bain marie et le TCA a été rajouté avant le substrat.

Annexe04 : La courbe d'étalonnage de la tyrosine

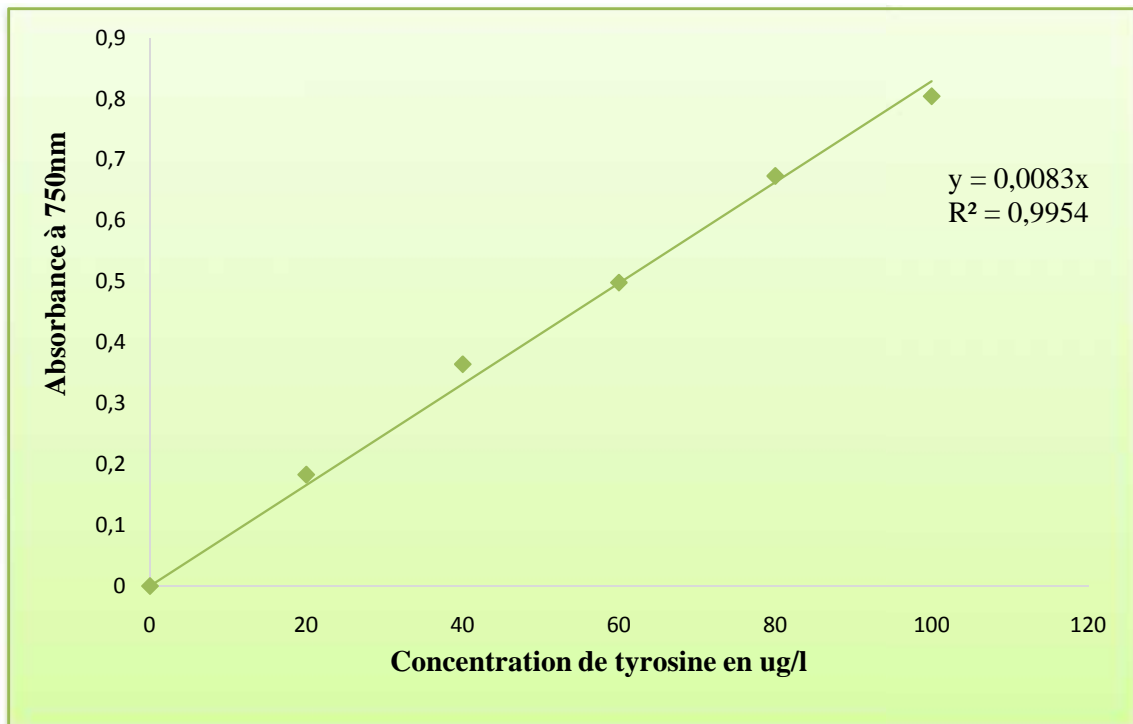


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine



Résumés

Abstract

The purpose outlined in this approach is to study the effect of temperature on alkaline protease production on chicken feather based medium, by fungal strains isolated from hot spring, For this, fermentations of seven days at different temperatures (30, 35, 40 and 45 ° C) were performed in Erlenmeyer flasks; eleven molds were used to inoculate these. The best results of proteolytic activity were observed at 30 ° C and at 35 ° C, in particular in the last.

Therefore, strains that gave good yields were *Penicillium* sp. (1733.75 U) at 30 ° C, *Aureobasidium* sp. (1530 U) at 35 ° C and *Aspergillus* sp.4 (1530 U) at 35 ° C. Furthermore, significant activities have been detected by the strains. *Aspergillus* Sp.3 (670 U) at 40 ° C and *Trichoderma* sp (490 U) at 45°C, claiming their thermophilic characteristic. Calculating the percentage of the dry weight of degraded feather reveals significant levels resulting from strains *Aspergillus* sp.1 (72.8%) at 30 ° C, *Aspergillus* sp.4 (80.2%) at 35 ° C, *Aspergillus* sp.6 (89.1%) at 40 ° C and *Aureobasidium* sp. (33.6%) at 45 ° C. Thereafter, application tests were performed on crude extracts selected from the fermentation media which gave the best proteolytic results. Indeed, dehairing test performed on sheepskins was positive, particularly by extracts of *Aspergillus* sp.4 (35 ° C), of *Penicillium* sp. (30 ° C), of *Aspergillus* sp.1 (30 ° C) and of *Aspergillus* sp.1 (35 ° C), that reveal a very easy epilating. Natural proteins digestion test reveals that these proteases are able to hydrolyse completely the egg white. In contrast, only a few could dissolve the coagulated blood (*Aspergillus* extracts sp.2 at 35 ° C and 45 ° C, *Aspergillus* Sp.3 at 40 ° C and 40 ° *Aspergillus* sp.6 C). These proteases have also shown remarkable stability vis-à-vis laundry detergents talking on the detergent *LE CHAT*, where the enzyme activity was maintained 100% for the sp.1 *Aspergillus* extract (35 ° C) and *Aspergillus* Sp.3 (40 ° C). Examination of cloth pieces stained by blood after treatment with the extracts actually gave a good cleaning performance; and excellent washing if proteases are mixed with detergent *THE CAT*. Therefore, these results contribute to a possibility of using chicken feathers from the poultry industry as an effective fermentation substrate influencing the production of alkaline protease which may be a potential candidate for industrial use.

Key words: Protease, chicken feathers, Mold, wool pulling, Bio-detergent.

ملخص

الغرض أكد في هذا النهج هو دراسة تأثير درجة الحرارة على إنتاج الإنزيم القلوي في المتوسط مع ريش الدجاج من سلالات معزولة الفطرية من التربة ربيع حار، ولهذا، تخمير سبعة أيام في درجات حرارة مختلفة (30 35 40 45 درجة مئوية) أجريت في قوارير زجاجية أخرى. دمت إحدى عشرة قوالب لتطعيم هذه النتائج من النشاط بروتين عند 30 درجة مئوية و 35 درجة مئوية، وعلى وجه الخصوص في الماضي. 30 درجة مئوية، ذهبية الدعامات ليرة سورية. (1530 U) السلالات التي أعطت غلة جيدة: س البنسليوم. (75 1733 35 درجة مئوية. حساب النسبة المئوية من الوزن الجاف من (U 1530) sp.4 35 درجة مئوية، والرشاشيات (U sp.4 سلالات الرشاشيات (72.8) 30 درجة مئوية، SP.1 الريش المتدهورة يكشف مستويات كبيرة ناتجة عن 40 درجة مئوية، وذهبية الدعامات ليرة (89.1) sp.6 الرشاشيات (80.2) 35 درجة مئوية، الرشاشيات سورية. (33.6) 45 درجة مئوية. بعد ذلك، تم إجراء اختبارات التطبيق على استخراج النفط الخام مختارة من وسائل أجريت على جلود الغنم إيجابي، fellmongery الإعلام التخمير الذي أعطى أفضل النتائج بروتين. (30 SP.1 درجة مئوية)، البنسليوم. (30 درجة مئوية)، الرشاشيات (35) sp.4 سيما من الرشاشيات مقتطفات (درجة مئوية)، والتي تكشف عن إزالة الشعر من السهل جدا. البروتينات الطبيعية الهضم (35 SP.1 مئوية) والرشاشيات ماما بياض البيض. من سلبيات، سوى عدد قليل كانوا قادرين على solubilise فحص يكشف أن هذه البروتياز قادرة على THE . وقد أظهرت هذه البروتياز أيضا استقرارا ملحوظا وجها لوجه المنظفات التحدث على المنظفات Sp.3 الرشاشيات استخراج (35 درجة مئوية) والرشاشيات SP.1، حيث تم الحفاظ على نشاط الإنزيم 100 CAT (درجة مئوية). فحص الأقمشة القطنية المتسخة بدم بعد العلاج مع مقتطفات فعلا أعطيا أداء تنظيف جيدة. (40 إذا تختلط البروتياز مع المنظفات اتفاقيه مناهضة التعذيب. ولذلك، تسهم هذه النتائج إلى إمكانية استخدام ريش الدجاج من صناعة الدواجن باعتبارها الركيزة التخمر الفعالة التي تؤثر على إنتاج الأنزيم البروتيني القلوي الذي يمكن أن يكون

الكلمات المفتاحية: الأنزيم البروتيني، ريش الدجاج، العفن، سحب الصوف، بيو المنظفات.

Date de soutenance :

27/06/2016

Présenté par : **BOUREGHIDA Feriel**

BRACHENE Abir

Thème : Etude de l'effet de la température sur la production de la protéase alcaline. Tests biotechnologiques.

Résumé

Le but souligné dans cette présente approche est d'étudier l'effet de la température sur la production de la protéase alcaline sur milieu à base de plumes de poulet, par des souches fongiques isolées du sol de source thermale, Pour cela, des fermentations de sept jours à différentes températures (30, 35, 40 et 45°C) ont été réalisées en erlenmeyers ; onze moisissures ont été utilisées pour inoculer ces derniers. Les meilleurs résultats d'activité protéolytique ont été observés à 30°C et à 35°C, notamment sous la dernière. De ce fait, les souches qui ont donné les bons rendements sont : *Penicillium sp.* (1733,75 U) à 30°C, *Aureobasidium sp.* (1530 U) à 35°C et *Aspergillus sp.4* (1530 U) à 35°C. Le calcul du pourcentage du poids sec des plumes dégradées révèle des teneurs importantes en résultent par les souches *Aspergillus sp.1* (72,8 %) à 30°C, *Aspergillus sp.4* (80,2 %) à 35°C, *Aspergillus sp.6* (89,1 %) à 40°C et *Aureobasidium sp.* (33,6 %) à 45°C. Par la suite, des tests d'application ont été réalisés sur des extraits bruts sélectionnés à partir des milieux de fermentation ayant donné les meilleurs résultats protéolytiques. En effet, le test de délainage réalisé sur des peaux de mouton était positif, notamment par les extraits d'*Aspergillus sp.4* (35°C), de *Penicillium sp.* (30°C), d'*Aspergillus sp.1* (30°C) et d'*Aspergillus sp.1* (35°C), qui révèlent une épilation très facile. Le test de digestion des protéines naturelles révèle que ces protéases sont capables de solubiliser complètement le blanc d'œuf. Par contre, seulement quelques unes ont pu dissoudre le sang coagulé. Ces protéases ont également montré une stabilité remarquable vis-à-vis des détergents à lessive en parlant sur le détergent *LE CHAT*, où l'activité enzymatique a été maintenue 100 % pour l'extrait d'*Aspergillus sp.1* (35°C) et d'*Aspergillus sp.3* (40°C). L'examen des tissus de coton salis par le sang après traitement par les extraits a effectivement donné une bonne performance de nettoyage ; et un excellent lavage dans le cas où les protéases sont mélangées avec le détergent *LE CHAT*. Par conséquent, ces résultats contribuent à une possibilité d'utilisation des plumes de poulet issues de l'industrie de volaille comme un substrat de fermentation efficace influençant la production de la protéase alcaline qui pourrait être un candidat potentiel pour un usage industriel.

Mots-clés Protéase, Plumes de poulets, Moisissures, Délainage, Bio-détergent.

Laboratoire de recherche Laboratoire de Microbiologie (RDC)

Université des Frères Mentouri Constantine

Jury de soutenance

Présidente : **Mme. MERGOUD L.**
Rapporteur : **Melle. BELMESSIKH A.**
Examinatrice : **Melle. ABDELAZIZ W.**

M.A.A. U.F. Mentouri Constantine
M.A.A. U.F. Mentouri Constantine
M.A.A. U.F. Mentouri Constantine

Etude de l'effet de la température sur la production de la protéase alcaline. Tests d'applications biotechnologiques sur l'enzyme

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Le but souligné dans cette présente approche est d'étudier l'effet de la température sur la production de la protéase alcaline sur milieu à base de plumes de poulet, par des souches fongiques isolées du sol de source thermale, Pour cela, des fermentations de sept jours à différentes températures (30, 35, 40 et 45°C) ont été réalisées en erlenmeyers ; onze moisissures ont été utilisées pour inoculer ces derniers. Les meilleurs résultats d'activité protéolytique ont été observés à 30°C et à 35°C, notamment sous la dernière. De ce fait, les souches qui ont donné les bons rendements sont : *Penicillium sp.* (1733,75 U) à 30°C, *Aureobasidium sp.* (1530 U) à 35°C et *Aspergillus sp.4* (1530 U) à 35°C. Le calcul du pourcentage du poids sec des plumes dégradées révèle des teneurs importantes en résultent par les souches *Aspergillus sp.1* (72,8 %) à 30°C, *Aspergillus sp.4* (80,2 %) à 35°C, *Aspergillus sp.6* (89,1 %) à 40°C et *Aureobasidium sp.* (33,6 %) à 45°C. Par la suite, des tests d'application ont été réalisés sur des extraits bruts sélectionnés à partir des milieux de fermentation ayant donné les meilleurs résultats protéolytiques. En effet, le test de délainage réalisé sur des peaux de mouton était positif, notamment par les extraits d'*Aspergillus sp.4* (35°C), de *Penicillium sp.* (30°C), d'*Aspergillus sp.1* (30°C) et d'*Aspergillus sp.1* (35°C), qui révèlent une épilation très facile. Le test de digestion des protéines naturelles révèle que ces protéases sont capables de solubiliser complètement le blanc d'œuf. Par contre, seulement quelques unes ont pu dissoudre le sang coagulé. Ces protéases ont également montré une stabilité remarquable vis-à-vis des détergents à lessive en parlant sur le détergent *LE CHAT*, où l'activité enzymatique a été maintenue 100 % pour l'extrait d'*Aspergillus sp.1* (35°C) et d'*Aspergillus sp.3* (40°C). L'examen des tissus de coton salis par le sang après traitement par les extraits a effectivement donné une bonne performance de nettoyage ; et un excellent lavage dans le cas où les protéases sont mélangées avec le détergent *LE CHAT*. Par conséquent, ces résultats contribuent à une possibilité d'utilisation des plumes de poulet issues de l'industrie de volaille comme un substrat de fermentation efficace influençant la production de la protéase alcaline qui pourrait être un candidat potentiel pour un usage industriel.

Mots clés : Protéase, Plumes de poulets, Moisissures, Délainage, Bio-détergent.**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Microbiologie (RDC) Université des Frères Mentouri Constantine**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	Mme. MERGOUD L.	M.A.A. U.F.Mentouri Constantine
Rapporteur :	Melle. BELMESSIKH A.	M.A.A. U.F.Mentouri Constantine
Examinatrice :	Melle. ABDELAZIZ O.	M.A.A. U.F.Mentouri Constantine

Date de soutenance : 27/06/2016